

Aus dem Institut für Parasitologie und Parasitäre Krankheiten
der Tiere

der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. G. Lämmler

**Zur in vitro-Excystation und -Resistenz von Sporozoiten
der Kokzidienart *Eimeria stiedai* (LINDEMANN, 1865)
KISSKALT & HARTMANN 1907**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Joachim Krieg
Tierarzt aus Karlsruhe

Gießen 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545914_0011

Aus dem Institut für Parasitologie und Parasitäre Krankheiten
der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. G. Lämmle

**Zur in vitro-Excystation und -Resistenz von Sporozoiten
der Kokzidienart *Eimeria stiedai* (LINDEMANN, 1865)
KISSKALT & HARTMANN 1907**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Joachim Krieg
Tierarzt aus Karlsruhe

Gießen 1971

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Prof. Dr. G. Lämmler

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Lämmler

Tag der mündlichen Prüfung: 7./8. Juli 1971



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Schrifttum	2
A. Excystation	2
B. Anreicherung	8
C. Kriterien der Lebensfähigkeit	9
D. Lebensdauer	11
III. Material und Methodik	17
1.) Allgemeine Versuchsanordnung und Vorversuche	17
2.) Endgültige Versuchsanordnung und -durchführung	23
3.) Spezielle Versuchsanordnung	29
A. Excystation	31
B. Versuche mit Sporocysten	33
C. Lebensdauer excystierter Sporozoiten unter verschiedenen chemischen und physikalischen Einflüssen	34
1. ExcystationsmEDIUM und dessen Bestandteile	35
2. Verschiedene Kochsalz - Konzentrationen	35
3. Kaliumbichromat	37
4. Verschiedene pH Werte	38
5. Verschiedene Temperaturen	39
6. Zentrifugation	40
7. Eintrocknung	41
8. Serum und Medien, die Serum enthalten	41
9. Unterschiedliches Alter der Oocysten	43
IV. Ergebnisse	44
A. Excystation	44
B. Versuche mit Sporocysten	49

C. Lebensdauer excystierter Sporozoitcn unter verschiedenen chemischen und physikalischen Einflüssen	54
1. Excystationsmcdium und dessen Bestandteile	54
2. Verschiedene Kochsalz - Konzentrationen	60
3. Kaliumbichromat	76
4. Verschiedene pH Werte	80
5. Verschiedene Temperaturen	85
6. Zentrifugation	89
7. Eintrocknung	91
8. Serum und Medien, die Serum enthalten	92
9. Unterschiedliches Alter der Oocysten	102
V. Diskussion	106
VI. Zusammenfassung	123
VII. Literaturverzeichnis	126

I. EINLEITUNG

In der parasitologischen Forschung werden heute zur Lösung der verschiedensten Probleme, insbesondere zur Beantwortung spezieller physikalischer, chemischer, biochemischer und immunologischer Fragestellungen in zunehmendem Maße in vitro - Techniken verwendet. Bei Versuchen mit Kokzidien bedeutet dies, daß aus den exogenen Stadien, den Oocysten, die eigentlichen infektiösen Stadien, die Sporozoiten, freigesetzt werden müssen, um sie zu experimentellen Untersuchungen heranziehen zu können. In der Literatur liegen mehrere Arbeiten über Versuche mit Sporozoiten am Wirtstier oder in der Zellkultur vor. Hierbei wird jedoch bezüglich der Lebensfähigkeit von Sporozoiten jeweils nur der gerade interessierende Gesichtspunkt erwähnt. Systematische in vitro-Untersuchungen über die Resistenz der Sporozoiten gegen chemische oder physikalische Einflüsse fehlen. Aus diesem Grund soll mit der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, einige dieser Fragen zu klären.

II. SCHRIFTTUM

A. Excystation

Erste Versuche, Sporozoiten in vitro zum Excystieren zu bringen, wurden bereits um die Jahrhundertwende unternommen.

So gelang es METZNER (1903) nach Vermischung von Darmsaft aus dem Duodenum vom Hund oder Kaninchen mit sporulierten Oocysten von "Coccidium cuniculi", bei einer Temperatur von 35⁰ C die Sporozoiten zu aktivieren. Er beschreibt, wie sie nach etwa einer Stunde aus den Sporocysten ausschlüpfen, sich einige Zeit innerhalb der Oocysten umherbewegten und schließlich diese durch die Mikropyle verließen. Als ebenso wirksam und besser erwiesen sich Pankreassaft vom Hund und Kaninchen, sowie zu dieser Zeit handelsübliche Präparate wie Pankreatin - Glycerin, Trypsin sicc. und Pankreatin depurat. in Kochsalzlösung, während mit Magensaft vom Kaninchen oder Hund weder Excystation noch Sporozoiten - Aktivierung erzielt werden konnten.

In der folgenden Zeit wurden nur vereinzelt Excystationenversuche und Methoden beschrieben, die keine wesentlich neuen Erkenntnisse über den Excystationsvorgang lieferten, so daß sie hier nicht erwähnt werden sollen. Erst in den letzten 12 Jahren wurden exaktere Excystationsvorgänge entwickelt, indem man versuchte, den Entwicklungszyklus von Kokzidien in Zellkulturen zu beobachten und die Ultrastruktur der Sporozoiten aufzuklären. Die zahlreichen Literaturangaben sind in der Tabelle 1 (S. 7) kurz zusammengefaßt.

Grundsätzlich wird stets zwischen zwei Faktoren unterschieden, die den Prozeß der Excystation induzieren. Der erste Faktor wirkt auf die Oocystenwand ein, der zweite auf die Sporocysten mit den Sporozoiten.

Als ersten Faktor verwendeten einige Verfasser CO₂ - Gas, das sie entweder rein oder in einem Gemisch mit Luft oder Stickstoff durch die sporulierten Oocysten leiteten. Die Dauer dieser Vorbehandlung betrug stets mehrere Stunden; in manchen Versuchsanordnungen wird sogar von 10; 18; 24 oder 30 Stunden langer Einwirkungszeit berichtet.

Wesentlich weniger Zeit war für die andere, von vielen Autoren

angewandte Methode erforderlich. Hierbei wurden die Oocystenwände mit mechanischen Hilfsmitteln zerstört und so die Sporocysten freigesetzt. Dieser Vorgang dauert nach Angaben in der Literatur etwa 5 bis 15 Minuten.

NORTON, POUT und JOYNER (1968) kombinierten beide Verfahren miteinander, indem sie sporulierte Eimeria acervulina - Oocysten zunächst 3 bis 4 Stunden lang einer CO_2 - Behandlung aussetzten und danach durch mechanische Zerstörung freie Sporocysten gewannen.

Ein anderes Verfahren wandten LOTZE und LEEK (1960) mit gutem Erfolg an. Sie setzten die Oocysten bei $39,7^{\circ}\text{C}$ 12 bis 17 Stunden lang gefiltertem menschlichem Speichel oder 1 %iger Steapsinlösung aus.

Nach diesem ersten Faktor konnte nun der zweite folgen. Hierzu wurden die vorbehandelten Oocysten bzw. die freien Sporocysten in der Regel in physiologischer Kochsalzlösung, Ringerlösung oder PBS suspendiert. Als wirksame Zusätze zu diesen Medien dienten Trypsin oder Galle oder beide zusammen.

ROSE (1959) sowie LANDERS und COLLEY (1964) verwendeten nur Trypsin in 0,1 bzw. 0,5 %iger Konzentration, während LOTZE und LEEK (1960) reine Galle ohne Trypsin benutzten. Alle anderen in Tabelle 1 (S. 7) aufgeführten Autoren kombinierten die beiden Substanzen miteinander, wobei Trypsin meistens in 0,25 %iger, Galle am häufigsten in 5 bis 10 %iger Konzentration eingesetzt wurden.

Zusätzlich zu diesen beiden Komponenten fügten NYBERG und HAMMOND (1963 und 1964) Steapsin (= Lipase) als dritten wirksamen Bestandteil dem Medium bei. Auch DORAN und FARR (1961 b) arbeiteten mit Trypsin, Galle und Steapsin. Aus ihren Ergebnissen geht jedoch hervor, daß die Lipase keinen wesentlichen Einfluß auf die Excystation hatte.

DORAN (1966) berichtete, daß bei seinen Versuchen mit E. acervulina an Stelle von Trypsin auch die Präparate α , β , γ und δ - Chymotrypsin die gleiche Wirksamkeit haben.

Die Galle wurde meistens von den Wirtstieren der jeweiligen Eime-

ria - Species entnommen, manchmal jedoch auch von anderen Tierarten. Als guter Ersatz für tierische Galle erwiesen sich auch verschiedene Gallensalze (FARR und DORAN (1962 b), HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969) sowie LONG (1970)).

JACKSON (1962) betonte, daß zur Excystation von E. arloingi - Sporozoiten aus CO₂ - vorbehandelten Oocysten sowohl Trypsin als auch Galle erforderlich sind. Wurden die Oocysten zuerst in Galle gegeben, dann ausgewaschen und in Trypsinlösung inkubiert, so war die Excystation am besten, während bei umgekehrter Reihenfolge keine Wirkung zu beobachten war.

Bei Excystationsversuchen mit mechanisch befreiten E. acervulina - Sporocysten kamen DORAN und FARR (1962 a) zu dem Ergebnis, daß in unverdünnter Kükengalle keine Sporozoiten ausschlüpfen. In 1 %iger Trypsinlösung ohne Zusatz von Galle hatten nach 5 Stunden maximal 30,6 % der Sporozoiten excystiert. In einem Versuch wurden einige Tropfen 2,5 %iger Trypsinlösung zu einer Sporocystensuspension gegeben, die schon eine Stunde in unverdünnter Galle gestanden hatte. Nach einer weiteren Stunde waren 85 bis 90 % aller Sporozoiten frei. Bei der umgekehrten Reihenfolge - zuerst Trypsineinwirkung und dann Zusatz von Galle - excystierten weniger als 50 %.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden FARR und DORAN (1962 b) bei Versuchen mit E. acervulina, E. tenella, E. meleagridis und E. gallopavonis, daß in Trypsinlösung (0,25 %) ohne einen Zusatz von Galle nur wenige Sporozoiten excystierten. Diese Ergebnisse waren besser, wenn 1 % Natrium - Taurocholat zugegeben wurde, und am besten nach Zusatz von 5 % Galle zu der Trypsinlösung.

HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969) befaßten sich bei 11 Eimeria - Arten mit verschiedenen Faktoren, die Einfluß auf die Excystation haben. Sie beobachteten, daß bei CO₂ - vorbehandelten Oocysten Galle in Verdünnungen von 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 und 50 % keine Excystation bewirkte, wenn Trypsin nicht zugegeben wurde. Excystation trat aber dann ein, wenn die Galle einen hohen Gehalt an Bakterien und Pilzen hatte. Der Prozentsatz an excystierten Sporozoiten lag aber mit

ca. 3 % bei den verschiedenen Species sehr niedrig. Nur bei E. ellipsoidalis excystierten 56 % der Sporozoiten. Ein Medium mit 0,25 % Trypsin ohne Galle führte nach 4 Stunden zu einer Excystation von ca. 6 % bei E. bovis. Alle anderen untersuchten Eimeria - Arten (E. auburnensis, E. zürni, E. ninakohlyakimovi, E. ahsata, E. necatrix, E. acervulina, E. tenella, E. bilamellata und E. callospermophili) excystierten in diesem Medium überhaupt nicht.

Die Untersuchungen von ROBERTS, HAMMOND und SPEER (1970) an E. callospermophili und E. larimerensis ergaben ebenfalls, daß ein Medium mit Trypsin allein nur einen geringen Prozentsatz von Sporozoiten zum Excystieren bringt. Zu keiner Excystation kam es in Gallensalzlösung und in reiner physiologischer Kochsalzlösung. Jedoch bewegten sich die Sporozoiten in 34 bis 58 % der Sporocysten bei Verwendung von Gallensalzlösung, während in physiologischer Kochsalzlösung nur bei 4 bis 5 % der Sporocysten Bewegung beobachtet wurde. Nach Ansicht der Verfasser scheinen demnach Gallensalze die Motilität der Sporozoiten zu stimulieren, ebenso wie die der Merozoiten (SPEER, HAMMOND und KELLEY, 1970).

Über die Möglichkeit, frisch hergestelltes Excystationsmedium bei -40° oder -20°C aufzubewahren und kurz vor Gebrauch aufzutauen, berichten NYBERG und HAMMOND (1964) sowie DORAN und VETTERLING (1967 b).

Neben Trypsin und Galle wurde auch der Einfluß von verschiedenen Pufferlösungen auf die Excystation untersucht. JACKSON (1962) behandelte sporulierte und in isotonischer Bicarbonat - und Phosphat - Pufferlösung suspendierte Oocysten mit CO₂ und stellte nach Zusatz von Trypsin und Galle fest, daß die Excystationsrate nur gering war. Wurde die Pufferlösung verdünnt, so schlüpften die Sporozoiten besser aus; wenn die Oocysten vor der Inkubation in Trypsin und Galle mit Wasser ausgewaschen waren, war die Excystation am besten. Auch NYBERG und HAMMOND (1964) weisen auf einen negativen Einfluß von Phosphat - und Acetatpuffern hin.

HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969) fügten dem Excystations-

medium erst nach der Oocysten - Vorbehandlung verschiedene Puffer bei. Mit Natriumbicarbonat und Trismaleat erzielten sie gute Excystationsergebnisse; dagegen erwiesen sich andere Puffer (Phosphat, Borsäure - Borax, Ammediol und Glycin - NaOH, jeweils 0,2 M) als weniger bzw. gar nicht geeignet.

Die Temperaturen, bei denen die einzelnen Autoren die vorbehandelten Oocysten inkubierten, lagen zwischen 37⁰ und 43⁰ C. Die Excystationsmedien wurden auf bestimmte pH Werte eingestellt, meist ca. 7,5 (7,3 bis 8,5).

Die Angaben über die Behandlungsdauer mit dem Excystationsmedium sind, wie aus Tabelle 1 (S. 7) ersichtlich, zum Teil recht unterschiedlich. Während bei manchen Autoren bereits nach 30 Minuten oder noch früher die meisten Sporozoitien excystiert hatten, berichten andere über Inkubationszeiten bis zu 10 Stunden.

Einige Verfasser, u. a. FARR und DORAN (1962 b), HIBBERT und HAMMOND (1966), DORAN und VETTERLING (1967 a), HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969) sowie BUNCH und NYBERG (1970) weisen darauf hin, daß nach gleicher Vorbehandlung und im gleichen Medium verschiedene Eimeria - Species zum Teil recht unterschiedlich schnell excystieren und die Prozentsätze der aktivierten und ausgeschlüpften Sporozoitien oft stark differieren.

LONG (1970) berichtete, daß auch das Alter der Oocysten eine Rolle spielt. Bei vergleichenden Untersuchungen mit 15 bis 162 Tage alten Oocystenkulturen stellte er fest, daß aus den jüngsten Oocysten mehr Sporozoitien ausschlüpften als aus älteren.

Aus mehreren Literaturangaben geht hervor, daß Spuren von Kaliumbichromat die Excystation negativ beeinflussen. JACKSON (1962) erzielte mit E. arloingi - Oocysten, die in Kaliumbichromat sporuliert hatten, schlechtere Excystationsergebnisse als mit Oocysten nach der Sporulation in reinem Wasser. Er vermutet, daß durch das Kaliumbichromat zwar die Wirksamkeit der CO₂ - Vorbehandlung der Oocysten nicht beeinflußt wird, daß aber die Permeabilität der Oocystenwände für die Trypsin - Galle - Lösung herabgesetzt ist. NYBERG und HAMMOND (1964),

Entom. species	Pathogen	Medium	Zusätze	Temperatur °C	pH	Behandlungs- dauer	Exystation %	Literatur
arlingi	CO ₂	P BBS	Trypsin 0,25% Schafgalle 10%	39	7,4			Jackson (1962)
bovis	CO ₂	physiol. NaCl	Trypsin 0,5% Galle 5%	37		6 h	95,3	Nyberg, Hammond (1963)
nieschulzi	CO ₂	physiol. NaCl	Trypsin 0,5%					Landers, Colley (1964)
tenella, arlingi	CO ₂	PBS	Trypsin 0,25% Schafgalle 7%	39	7,4	2-2,5 h		Jackson (1964)
bovis, aburnensis, ellipsoidalis	CO ₂ oder mechanisch							
bovis	CO ₂	physiol. NaCl	Trypsin 0,5% Rindergalle 5%	37	7,5	1-6 h	90	Nyberg, Hammond (1964)
u. a.			Trypsin 0,5% fr. Rindergalle u. a. ca. 50%	39-41		10 h		Hibbert, Hammond (1966)
tenella	CO ₂	physiol. NaCl	Trypsin 0,5% Rindergalle 5%	38-41	7,5	bis 8 h	89-93	Nyberg, Bauer, Knapp (1968)
acervulina	CO ₂ und mechanisch	sterile Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Kükengalle 10%	37		30 Min.		Norton, Pout, Joyner (1968)
bovis u. a.	CO ₂		Trypsin 0,25% fr. Rinder- bis 0,5% galle 8%	39	6-10	4 h	82-94	Hibbert, Hammond, Simmons (1969)
faurei, arlingi, minakohlyakimovi	Speichel od. Steapsin		Galle v. Schwein, Schaf, Küken od. Kaninchen, jeweils rein	39,7 (103,5°F)		0,5-2,5 h		Lotze, Leek (1960)
stiedai	mechanisch	physiol. NaCl	Trypsin 0,1%	37	7,8			Rose (1959)
acervulina	mechanisch		Trypsin 0,25% Geflügelgalle 5%		7,3-7,6			Doran, Farr (1961) b
acervulina	mechanisch		Trypsin 0,25% Kükengalle 5%			1 h	95-98	Doran, Farr (1961 a)
acervulina	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Kükengalle 5%	37-41	7,6		92	Doran, Farr (1962 a)
acervulina, tenella, meleagrididis, gallopavonis	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Küken- od. fruhabgalle, od. Na-Taurocholat 5%	37-41	7,3-7,6	1-3-5 h		Farr, Doran (1962 b)
acervulina	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin od. α , β , δ -Chymotrypsin 0,0014gms/100,0	37	7,4-7,5	1 h	60-95	Doran (1966)
bovis	mechanisch	physiol. NaCl	Trypsin 0,2% Rindergalle 5%	37		2-2,5 h		Fayer, Ham and (1967)
meleagrididis, necatrix, acervulina, gallopavonis	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Kükengalle 5%			bis 30 Min.	über 75 %	Doran, Vetterling (1967 a)
meleagridis	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Kükengalle 5%	37-41	7,3-7,8	15 Min.	85-95	Doran, Vetterling (1967 b)
meleagridis	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Kükengalle 5%	37-41	7,3-7,8	25 Min.	80-95	Doran, Vetterling (1968 b)
adenoides, mivati, tenella	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin Galle	43			85-90	Doran (1969)
tenella	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Kükengalle 5%	41,5	7,6-8,0	2-4 h	90-95	Wagenbach (1969)
tenella	mechanisch	PBS	Trypsin 1% Gefl. Galle 5-10%		7,4	3 h	90	Shibalowa, Korolew (1969)
adenoides,	mechanisch	Ringerlsg.	Trypsin 0,25% Kükengalle 5%	43			90	Doran (1970 c)

Tabelle 1

Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Excystationsmethoden

NYBERG, BAUER und KNAPP (1968), NORTON, POUT und JOYNER (1968) sowie LONG (1970) erwähnten im Rahmen ihrer Versuche mit verschiedenen Eimeria - Species, daß sie die Oocysten vor ihrer Verwendung durch wiederholtes Zentrifugieren auswuschen, um das Kaliumbichromat zu entfernen, in dem die Oocysten sporuliert hatten und aufbewahrt worden waren.

B. Anreicherung

Für Versuche an Zellkulturen oder immunologische Untersuchungen ist es oft erforderlich, mit großen Mengen von Sporozoiten zu arbeiten. Dazu wurden entweder die Sporocysten vor der Excystation angereichert oder die bereits ausgeschlüpften Sporozoiten konzentriert und gereinigt.

Nach mechanischer Zerstörung der Oocystenschalen zentrifugierten LONG, ROSE und PIERCE (1963) diese Suspensionen 5 Minuten lang bei annähernd 60 g und ließen die Röhrchen danach eine halbe Stunde stehen. Der Überstand enthielt dann Sporocysten und eine nur geringe Anzahl von Oocysten. DORAN und VETTERLING (1967 a) zentrifugierten zur Sporocystenanreicherung gemörserte Oocysten 5 Minuten lang bei 460 g oder 1500 g (1967 b). Auch NORTON, POUT und JOYNER (1968) konzentrierten die Sporocysten nach mechanischer Vorbehandlung von E. acervulina - Oocysten durch Zentrifugation.

ROSE (1959) ließ zermörserte Oocysten von E. stiedai in einem Teströhrchen excystieren und beschreibt, daß sich der Oocystendebris innerhalb von 5 bis 10 Minuten am Boden absetzte; der Überstand der Suspension enthielt weitgehend nur Sporozoiten. HERLICH (1965) arbeitete mit Sporozoiten von E. tenella und E. acervulina, die er mit PBS aus dem Dünndarm infizierter Küken auswusch. Die so erhaltene Suspension zentrifugierte er 5 Minuten lang bei 6 g und beschreibt, daß danach im Bodensatz reichlich Sporozoiten vorhanden waren. NORTON, POUT und JOYNER (1968) verdünnten nach Abschluß der Excystation das Medium, in dem sich Sporozoiten, leere Sporocysten sowie intakt gebliebene Oocysten befanden, zentrifugierten es leicht und entfernten dann sorg-

fältig den Überstand, der die Sporozoiten enthielt. Danach konzentrierten sie die Sporozoiten durch erneutes Zentrifugieren.

Einer komplizierteren Methode zur Reinigung und Anreicherung von E. tenella - Sporozoiten bediente sich WAGENBACH (1969). Er ließ Suspensionen von mechanisch zerstörten Oocysten, nachdem diese in Medium mit Trypsin und Galle bebrütet worden waren und die meisten Sporozoiten excystiert hatten, durch Säulen laufen, die mit Glasperlen von 200 μ Durchmesser gefüllt waren. Als Medium benutzte er eine Ringerlösung mit bestimmter Ionenstärke und osmotischer Konzentration, von deren Einhaltung die Funktion der Glasperlensäulen abhängig war. Als optimale Fließgeschwindigkeit ergab sich 7 bis 10 ml pro Minute. Er berichtet, daß mit dieser Methode so gut wie alle intakten Oocysten sowie anderer Debris und die Hüllen der zerstörten Oocysten an den Glasperlen haften blieben, während die Sporozoiten die Säulen passierten und in ziemlich reiner Form im Filtrat erschienen. Die meisten Partikel, die die Sporozoitensuspension verunreinigten, waren Sporocysten mit nicht ausgeschlüpften Sporozoiten, seltener leere Sporocystenhüllen. Der größte Teil dieser Sporocysten wurde durch 2 bis 3 weitere Säulendurchgänge beseitigt.

DORAN (1970 a) reinigte seine Sporozoitensuspensionen, indem er sie durch zwei Säulen mit Glasperlen von 100 μ Durchmesser laufen ließ.

C. Kriterien der Lebensfähigkeit

Als Kriterien der Lebensfähigkeit von Sporozoiten werden in der Literatur angegeben:

- | | | |
|------------|------------------|------------------------|
| 1) Färbung | 2) Beweglichkeit | 3) Infektionsfähigkeit |
|------------|------------------|------------------------|

WAGENBACH (1969) benutzte die Färbung zur Differenzierung von lebenden und toten Sporozoiten. Er mischte 3 Tropfen Zellsuspension und 1 Tropfen Trypanblau in Ringerlösung und berichtet, daß nur die toten Sporozoiten die Farbe annahmen. DORAN (1969) unterschied lebende und tote Sporozoiten von E. adenoides, E. mivati und E. tenella mit Hilfe des Farbstoffes Nigrosin. Er beurteilte die Sporozoiten als lebend,

wenn sie bei Beobachtung auf dem Wärmetisch bei 37⁰ bis 43⁰ C beweglich waren und sich nicht mit 1 % Nigrosin färbten.

Zahlreiche Autoren berichten über verschiedene Bewegungsarten bei Sporozoiten. DÜRR (1971) faßte diese Angaben - ergänzt durch eigene Beobachtungen - zusammen und schildert insgesamt vier Bewegungstypen bei Sporozoiten, eine vom Ort und drei am Ort:

1. "gliding", Fortbewegung: in unregelmäßigen Zeitabständen stattfindendes, ruck- oder stoßartig beginnendes und langsam auslaufendes Gleiten;
2. "probing": Seitwärtsbewegungen und/oder periodische Kontraktionen der vordersten Spitze des Sporozoiten bei sonst nicht bewegtem Körper;
3. "flexing": Beugebewegungen, bei denen das Vorderende, meist das vordere Drittel des Sporozoiten langsam seitlich bis zu 90⁰ und mehr abgebeugt wird und schnell in die Normallage zurückkehrt;
4. "pivoting": Pendelbewegungen des ganzen Sporozoiten um einen Fixpunkt an seinem Hinterende.

JACKSON (1964) machte einige Angaben über die Lebensdauer von E. arloingi - Sporozoiten und beurteilte diese nach der Beweglichkeit. HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969) bestimmten ebenfalls die Lebensfähigkeit von verschiedenen Sporozoiten nach ihrer Beweglichkeit unter dem Phasenkontrastmikroskop auf einem Wärmetisch bei 39⁰ C. Andererseits erwähnen DORAN und VETTERLING (1969 b) bei ihren Versuchen an tiefgefrorenen Oocysten, Sporocysten und Sporozoiten, daß excystierte und tiefgekühlte Sporozoiten von E. tenella und E. meleagridis nach dem Auftauen morphologisch ähnlich aussahen wie frisch excystierte; auf Grund ihrer typischen trägen Beweglichkeit sei es aber unmöglich zu sagen, ob sie lebten. Erst die Inoculation in ihre natürlichen Wirte erbrachte den Beweis der Lebensfähigkeit, da die dabei hervorgerufene Infektion genauso gut oder noch besser war, als wenn die Tiere mit entsprechenden Mengen von frischen Oocysten infiziert worden wären.

Auch für WAGENBACH (1969) galt neben der Anfärbbarkeit die Infektiosität von Sporozoiten als Bestätigung der Lebensfähigkeit. Ebenso

beurteilen LONG, ROSE und PIERCE (1963), HERLICH (1965), NORTON, POUT und JOYNER (1968), DORAN und VETTERLING (1969 a u. b), LONG (1970) sowie DORAN (1970 b, c u. d) die Lebensfähigkeit von Sporozoiten an Hand der Infektionsstärke nach der Inoculation am entsprechenden Wirtstier oder in der Zellkultur.

D. Lebensdauer

Über die Lebensdauer von Sporozoiten unter verschiedenen chemischen oder physikalischen Einflüssen liegen von mehreren Autoren allerdings zum Teil nur spärliche Angaben vor.

Bei vergleichenden Excystationsversuchen mit den im Duodenum lebenden Geflügelkokzidien E. acervulina und E. meleagridis sowie mit dem im Caecum parasitierenden Species E. tenella und E. gallopavonis stellten FARR und DORAN (1962 b) fest, daß in allen benutzten Excystationsmedien die meisten Caeca - Sporozoiten 3 bis 5 Stunden zum Ausschlüpfen benötigten, während nach dieser Zeit die Duodenal - Species, die schon zum größten Teil nach einer Stunde excystiert hatten, bereits nicht mehr lebensfähig waren.

Nach Angaben von DORAN und FARR (1962 a) führten höhere Konzentrationen von Trypsin im Medium zum Tod der ausgeschlüpften Sporozoiten, deren Aussehen dann nicht mehr normal war. Die gleichen Autoren (1961 a) stellten fest, daß im Excystationsmedium nach Zusatz von Antibiotika von den wenigen ausgeschlüpften Sporozoiten viele beschädigt waren.

FAYER und HAMMOND (1967) untersuchten die Lebensfähigkeit von E. bovis - Sporozoiten in verschiedenen Medien (bei pH 7,4 und 39° C). Nach ihren Ergebnissen blieben die Sporozoiten in LE - Medium (Lactalbumin - Hydrolysat und Earle's balanced salt solution) mit 10 % Rinderserum 21 Stunden lang beweglich, dagegen nur 6 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung, Excystationsmedium und in LE - Medium mit 10 % Lämmerserum. Freie und bewegliche Sporozoiten wurden in Thymus- und Hodenzellkulturen noch nach 5 und 7 Tagen, in Milz- und

Nierenzellkulturen sogar nach 18 Tagen gefunden.

DORAN und FARR (1962 a), die als Medium für die Excystation von E. acervulina Ringerlösung benutzten, fanden, daß die Sporoziten keine Stunde überlebten, wenn an Stelle von Ringerlösung Aqua dest. verwendet wurde.

HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969) berichteten, daß Sporoziten verschiedener Eimeria - Species bei pH 6 bis pH 10 beweglich waren, die größte Aktivität jedoch bei pH 7 bis pH 9 lag.

Nach Angaben von WAGENBACH (1969) blieben E. tenella Sporoziten bei + 1° C in Ringerlösung bei einer Ionenstärke von $\mu = 0,330$ mindestens 1 bis 2 Tage lebensfähig; nach 5 bis 6 Tagen waren nur noch wenige lebende Sporoziten übrig. In physiologischer Kochsalzlösung von $\mu = 0,147$ und pH 8,8 hielten sich die Sporoziten bei + 1° C zu mindestens 90 % 6 Tage lang; danach nahm die Lebensfähigkeit ab auf 80 % nach 15 Tagen und 55 % nach 25 Tagen.

Durch CO₂ - Behandlung von E. arloingi - Oocysten gewann JACKSON (1964) freie Sporocysten. Diese Suspension behielt nach seinen Aussagen ihre Lebensfähigkeit bei + 4° C über viele Wochen. Frisch excystierte Sporoziten wurden vom ExcystationsmEDIUM freigewaschen und in "Hank's buffered balanced salt solution" suspendiert; dazu wurde inaktiviertes fetales Serum gegeben. Diese Sporoziten waren sehr beweglich und überlebten bei 37° C 24 Stunden lang, bei 4° C einige Tage.

Aus den Untersuchungen von JACKSON (1962) geht hervor, daß bei Temperaturen, die über 46° C liegen, keiner der excystierten Sporoziten überlebte.

KOUWENHOVEN (1967) bewahrte E. tenella - Sporoziten unter Zusatz von Glycerol oder Dimethylsulfoxyd (DMSO) 24 Stunden lang bei - 196° C auf und stellte fest, daß sie danach noch völlig infektiösfähig waren. Bei dem gleichen Verfahren mit Oocysten konnte dagegen keine Infektion erzielt werden.

LOTZE und LEEK (1967) fanden, daß die Excystation von E. tenella durch Abkühlung auf + 4° C reversibel unterbrochen werden konnte und

daß die Parasiten bei dieser Temperatur im ExcystationsmEDIUM 1 bis 2 Tage lang lebensfähig blieben.

DORAN und VETTERLING (1968 a) bewahrten Sporozoiten und Sporocysten nach Zusatz von 7 % DMSO als Gefrierschutz in flüssigem Stickstoff bei -196°C auf. Nach einem Monat tauten sie diese wieder auf und inokulierten damit Zellkulturen und Küken. Tiefgekühlte Sporozoiten führten zur Entwicklung von reifen Schizonten in der Zellkultur und riefen bei Küken genau so starke Infektionen hervor wie frisch excystierte. Hingegen erzeugten tiefgefrorene Sporocysten weniger starke Infektionen.

Ähnliche Versuche machten NORTON, POUT und JOYNER (1968). Sie arbeiteten mit E. acervulina - Sporozoiten, die sie mit 7,5 %igem Glycerol bis auf -70°C einfroren und in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrten. Noch nach 172 Tagen verursachten solche Sporozoiten an Küken Infektionen wie frisch excystierte. DMSO als Gefrierschutz erwies sich bei dieser Eimeria - Art als unbrauchbar, da die Sporozoiten nach dem Auftauen zum größten Teil degeneriert waren. DORAN (1969) experimentierte mit excystierten Sporozoiten von E. adenoides, E. mivati und E. tenella. Er variierte beim Einfrieren auf -80°C die Konzentration des DMSO, die Kühlgeschwindigkeit und die Äquilibrierungszeit und erreichte bei optimalen Werten ein Überleben des Gefrierprozesses von mehr als 70 % der Sporozoiten.

Weitere Versuche mit tiefgekühlten Kokzidien machte DORAN und VETTERLING (1969 b). Oocysten, Sporocysten und Sporozoiten von E. tenella und E. meleagridis wurden auf -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff bis zu 4 Monate aufbewahrt. Monatlich wurden Proben entnommen, aufgetaut und Versuchstieren inokuliert. Dabei ließen sich mit eingefrorenen Sporozoiten gleich gute Infektionen wie mit frisch excystierten erzeugen. Bei tiefgekühlten Sporocysten waren die Infektionsergebnisse schlechter, und mit gefrorenen Oocysten konnten keine Infektionen mehr erzielt werden. Ergänzend zu diesen Untersuchungen fand DORAN (1970 d), daß tiefgekühlte Oocysten von E. tenella, E. adenoides und E. mivati schon nach einwöchiger Aufbewahrung bei ihren natürlichen Wirten keine Infektion mehr hervorriefen. 8 Monate lang eingefrorene Sporozoiten bewirkten dagegen noch Infektionen, die nicht geringer

waren als mit frischen Sporozoiten. Bei Inoculation in Gewebekulturen lagen jedoch die Prozentsätze an intrazellulär gefundenen, vorher tiefgekühlten Sporozoiten stets niedriger als die von ungefrorenen Sporozoiten. Nach Ansicht von DORAN (1970 d) dürfte das Einfrieren die Fähigkeit der Sporozoiten herabsetzen, in Zellen einzudringen oder in den Inocula mehr als 5 Stunden zu überleben.

DORAN und VETTERLING (1969 a) untersuchten E. meleagriditis - Sporozoiten von 5 bis 60 Wochen alten Oocystenkulturen bezüglich ihrer Infektiosität in Zellkulturen. Sie stellten fest, daß bei zunehmendem Alter die Infektiosität abnahm. Die Ursachen sahen sie darin, daß bei älteren Oocystenkulturen viele Sporozoiten vor oder kurz nach der Excystation starben bzw. zum großen Teil unfähig waren, nach dem Eindringen in die Zellen zu überleben und sich dort weiterzuentwickeln.

Mit E. adenoides - und E. tenella - Sporozoiten testete DORAN (1970 c) deren Infektiosität an Gewebekulturen, und zwar vergleichsweise mit Sporozoiten aus jüngeren und älteren Oocysten, einmal eingefroren und einmal direkt nach der Excystation. Er berichtet, daß 48 Stunden nach der Inoculation der Prozentsatz der Entwicklungsstadien in den Zellkulturen bei gefrorenen wie bei frischen Sporozoiten aus jüngeren Oocysten gleich groß war, aber größer als nach Inoculation mit tiefgekühlten Sporozoiten aus älteren Oocysten.

LONG (1970) fand, daß Sporozoiten von E. tenella - Oocysten, die bei 4°C länger als 65 Tage aufbewahrt waren, nach Inoculation in Gewebekulturen bedeutend weniger lebensfähig waren als Sporozoiten aus frischen Oocysten. Er vermutet, daß die älteren Sporozoiten entweder nicht in die Kulturzellen eindringen können, oder daß sie zwar eindringen, aber nicht in der Lage sind, sich weiterzuentwickeln. Außerdem berichtet er, daß zwischen der Infektiosität von frischen Sporozoiten und von solchen, die 99 Tage in flüssigem Stickstoff gelagert hatten, kein großer Unterschied bestand.

LONG, ROSE und PIERCE (1963) befaßten sich mit der Wirkung verschiedener Hühnerseren auf Merozoiten, Sporozoiten und Sporocysten von E. tenella. Bei der Beurteilung in vitro und in vivo kamen sie zu fol-

genden Ergebnissen: in 30 Minuten lang bei 56⁰ C erhitztem und in nicht erhitztem Normalserum und Immunserum wurden gleichartige morphologische Veränderungen beobachtet. Die sonst normalerweise sichelförmigen Sporozoiten nahmen eine mehr rundliche und plumpe Gestalt an, blieben dabei aber beweglich. Die Infektiosität war nach Inkubation in nicht erhitztem Normalserum und Immunserum sowie in erhitztem Immunserum vermindert, blieb jedoch in erhitztem Normalserum erhalten, desgleichen in 1 : 3 bis 1 : 24 verdünnten Immunseren. Weder in erhitztem noch in nicht erhitztem Normalserum beobachteten sie Lysis. Immunserum dagegen lysierte Sporozoiten und Merozoiten nach einer Stunde bei 37⁰ C. Durch Erhitzen des Immunserums wurde der lytische Effekt beseitigt, nach Zugabe von Komplement oder Normalserum jedoch wiederhergestellt. In 17 von 21 nicht erhitzten Immunseren wurde bei Verdünnungen von 1 : 3 bis 1 : 24 Lysis von Merozoiten nachgewiesen. Ähnlich waren die Ergebnisse bei Sporozoiten. Die Infektiosität von Sporocysten wurde aber von keinem der Seren beeinflusst.

AUGUSTIN und RIDGES (1963) beobachteten bei E. meleagriditis - Merozoiten Lysis in nicht erhitztem Normalserum.

HERLICH (1965) inkubierte sporulierte Oocysten, excystierte Sporozoiten und Merozoiten II. von E. tenella und E. acervulina in Normalserum und Serum von Küken, die gegen die entsprechenden Eimeria - Species immunisiert und hyperimmunisiert waren. Die Seren hatten keinen Einfluß auf die sporulierten Oocysten. Die Sporozoiten erschienen bei 40⁰ C noch nach eineinhalb Stunden in jedem der getesteten Seren morphologisch normal und beweglich. Nach 2 Stunden aber waren sie in den homologen Hyperimmunseren bei normalem Aussehen unbeweglich, in den anderen Medien noch aktiv. Agglutination und Lysis wurden nicht beobachtet. Inoculation dieser Sporozoiten führte bei Küken zu sehr geringen oder gar keinen Infektionen mit E. tenella, während sich bei E. acervulina keine größeren Unterschiede gegenüber Kontrolltieren ergaben, die mit in PBS inkubierten Sporozoiten inoculiert worden waren.

Nach Angaben von BURNS und CHALLEY (1965) wurden Sporozoiten von E. tenella in Serum von nicht infizierten Küken lysiert. Dieser Effekt verschwand bei 1 : 3 Verdünnung des Serums. Auch Immunserum,

zu verschiedenen Zeiten p.i. entnommen, führte zur Lysis der Sporozoiten. Hierbei wurde die lytische Wirkung der Seren durch Verdünnung nicht beseitigt. Die Lysis trat bei 37⁰ C nach 30 Minuten ein. Bereits nach 10 Minuten wurden Merozoiten in unverdünntem Immunserum lysiert, während in Normalserum keine Lysis erfolgte. Gelegentlich wurde Agglutination bei Merozoiten beobachtet. Dies geschah in Normal- wie auch in Immunserum. Weder Lysis noch Agglutination von Merozoiten fanden in erhitztem Immunserum statt, jedoch erschienen diese dicker und kürzer und verloren ihre Beweglichkeit, was in erhitztem wie in nicht erhitztem Normalserum ebenfalls gesehen wurde.

III. MATERIAL UND METHODIK

1.) Allgemeine Versuchsanordnung und Vorversuche

Zur Untersuchung von freien Sporozoiten war es zunächst erforderlich, ein geeignetes und zuverlässiges Excystationenverfahren zu entwickeln, um möglichst viele Sporozoiten in großer Dichte zur Verfügung zu haben. Diese Sporozoiten mußten außerdem innerhalb kurzer Zeit alle excystieren. Falls zum Beispiel in einem Medium nach einer Stunde 50 % geschlüpft wären, nach 3 Stunden 70 % und schließlich nach 5 Stunden 90 bis 100 %, so wäre bei Verwendung dieser Suspension kaum zu erwarten gewesen, daß alle Sporozoiten die gleichen Reaktionen zeigen würden. Zum Auffinden einer geeigneten Methode wurden mehrere Vorversuche durchgeführt.

Zur Verfügung standen sporulierte E. stiedai - Oocysten verschiedenen Alters, die aus Gallenblase, Gallengängen und Lebergewebe infizierter Kaninchen ausgewaschen und nach der Sporulation in 2 %iger Kaliumbichromat - Lösung im Kühlschrank bei + 4⁰ C aufbewahrt worden waren.

Vor ihrer Verwendung wurden die Oocysten durch mehrmaliges Zentrifugieren so oft mit Leitungswasser ausgewaschen, bis die überstehende Flüssigkeit nahezu farblos und damit das Kaliumbichromat weitgehend entfernt war. Auf Grund der langen Einwirkungszeit bei der CO₂ - Vorbehandlung von Oocysten wurde die kürzere mechanische Methode vorgezogen.

Einige Tropfen einer Oocystensuspension wurden in einem Mörser mit dem Pistill so lange zerrieben, bis - bei zwischenzeitlicher mikroskopischer Kontrolle - die meisten Oocystenhüllen zerstört und damit die Sporocysten frei waren. Da für die meisten Versuche größere Mengen an Oocysten benötigt wurden, dauerte das Mörsern oft lange. Diese Arbeit konnte wesentlich erleichtert werden, wenn die Oocystensuspension zunächst zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit restlos abgegossen wurde. Für das Zermörsern dieses Oocystenzentrifugats wurde viel weniger Zeit benötigt als für weniger konzentrierte Oocystensuspensionen. So wurden zum Zerreiben eines ca. erbsengroßen Oocystenklumpens etwa

5 Minuten benötigt. Diese Methode wurde im folgenden stets angewandt.

Vorversuche zur Excystation

Zermörserte Oocysten wurden in einigen ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. In Anlehnung an die Excystationenversuche mit E. stiedai von ROSE (1959) wurde dieses Medium nach Zusatz von 0,1 % Trypsin auf einen pH Wert von 7,8 eingestellt und bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt. Im Abstand von 30 Minuten wurden Proben entnommen, um den Prozentsatz der excystierten Sporozoiten zu bestimmen. Die Ergebnisse waren bei mehreren Wiederholungen dieses Versuches sehr unterschiedlich. Nach 30 Minuten waren stets 10 bis 40 % der Sporozoiten ausgeschlüpft, nach einer Stunde 20 bis 50 %. Dieser Prozentsatz von maximal 50 % wurde manchmal auch erst nach 2 oder 3 Stunden erreicht und erhöhte sich auch nach längerer Inkubationszeit nicht.

Bei mikroskopischer Direktbeobachtung einer Probe auf dem Objektträger unterm Deckglas verlief die Excystation dagegen bei Einstellung des Heiztisches auf 37° C wesentlich schneller und ergiebiger; so schlüpfen innerhalb von 15 bis 20 Minuten nach Trypsinzusatz ca. 70 bis 80 % der Sporozoiten aus, während nach der gleichen Zeit bei Entnahme einer Probe aus der Stammsuspension im Brutschrank nur vereinzelt freie Sporozoiten beobachtet wurden.

Bei der gleichen Versuchsanordnung wie oben wurde die Trypsinmenge im Medium erhöht. Es wurden Konzentrationen von 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 und 5,0 % getestet. Bei Zusatz von 0,2 % Trypsin waren die Ergebnisse etwas besser als in 0,1 %iger Lösung, jedoch bei mehreren Wiederholungen ebenfalls sehr ungleichmäßig. Als bestes Ergebnis ergab sich ein Prozentsatz von 60 % excystierten Sporozoiten nach einer Stunde. Die höheren Trypsinkonzentrationen führten zu keiner Verbesserung der Excystationsraten.

Mit diesen Sporozoitensuspensionen wurden einige Versuche zur Bestimmung der Lebensfähigkeit gemacht. Bei der Untersuchung entnommener Proben unterm Deckgläschen excystierten laufend neue Sporozoiten. Daher war nach einem gewissen Zeitraum die Beurteilung des

Prozentsatzes von lebenden und toten Sporozoiten durch die neu hinzugekommenen außerordentlich unsicher. Um diese nachträgliche Excystation auszuschalten mußte versucht werden, die freien Sporozoiten von den Sporocysten zu trennen.

Vorversuche zur Anreicherung von Sporozoiten

Die von ROSE (1959) beschriebene Anreicherungsmethode (5 bis 10 Minuten langes Stehenlassen der Suspension) brachte keine befriedigenden Ergebnisse, ebenso wie die verschiedentlich angewandten Verfahren der Zentrifugation. Entweder waren im Überstand außer den freien Sporozoiten zu viele Sporocysten, oder bei längerer Sedimentation bzw. Zentrifugation erschienen die meisten Sporozoiten neben den Sporocysten, Oocysten und Debris ebenfalls im Bodensatz.

Danach wurde die Methode von WAGENBACH (1969) zur Reinigung excystierter Sporozoiten erprobt. Ein Glaszylinder wurde am unteren Ende mit einem Pfropfen aus Glaswolle versehen und mit Glasperlen von 180 bis 230 μ Durchmesser (Fa. E. Pospischil, Weidenberg) bis zur Hälfte gefüllt. Auf diese Säule wurde eine Suspension mit ca. 60 % excystierten Sporozoiten, Sporocysten, intakten Oocysten und anderem Debris gegossen, das durchtropfende Filtrat in einem Gefäß aufgefangen und untersucht.

Die gefilterte Suspension war frei von Oocysten und Debris, enthielt jedoch außer freien Sporozoiten auch reichlich Sporocysten. Auch bei Verwendung von Ringerlösung in der von WAGENBACH (1969) angegebenen Zusammensetzung anstelle von physiologischer Kochsalzlösung wurde nach Durchlauf durch die Glasperlen keine reinere Sporozoitensuspension gewonnen.

Die Tatsache, daß im Filtrat große Mengen von Sporocysten waren, wurde zum Anlaß genommen, zermörserte Oocysten - vor der Inkubation mit Trypsin - durch Glasperlen zu reinigen und dadurch reine Sporocystensuspensionen zu gewinnen.

Vorversuche zur Anreicherung von Sporocysten

Zermörserte Oocysten wurden in einigen ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und dann durch einen Glaszylinder mit Glasperlen geleitet. Beim Durchlauf bildete sich stets nach kurzer Zeit auf der obersten Lage der Glasperlen eine Schicht von Oocystendebbris, so daß die überstehende Flüssigkeit immer langsamer und schließlich gar nicht mehr weiterfließen konnte. Nach Aufwirbeln dieser Schicht durch Rühren mit einer Pipette wurde der Durchlauf wieder etwas beschleunigt, bis sich der Debris erneut abgesetzt hatte. Allerdings erschienen dann nach mehrmaliger Wiederholung des Rührens viele Oocysten und Schmutzpartikel im Filtrat.

Um diese Reinigungsmethode zu vereinfachen und vielleicht zu verbessern, wurde anstelle von Glasperlen Watte genommen. Bei variierter Stopfdichte in einem Plastikschlauch (15 cm lang, 1,5 cm Durchmesser) wurden verschiedene Wattepräparate verwendet und Suspensionen mit zermörserten Oocysten durchgeleitet. Mit diesem Verfahren wurde bei optimaler Stopfdichte (= Erfahrungswert) eine gute Sporocystenreinigung erzielt. Sämtliche intakt gebliebenen Oocysten, Oocystenhüllen und andere Partikel blieben in der Watte; die ausfließende Flüssigkeit war zwar etwas trüb, manchmal auch schmutzig-braun, enthielt jedoch ausschließlich Sporocysten, wobei die Ausbeute besser war als nach der Filterung durch Glasperlen. Außerdem war die Fließgeschwindigkeit erheblich höher, und erst bei Filtration größerer Mengen kam es zu einer beginnenden Verstopfung. Am besten geeignet war Augenwatte, die sich besser stopfen ließ und bei mikroskopischer Betrachtung eine gleichmäßigere Struktur aufwies als normale Verbandwatte.

Vorversuche zur Excystation aus gereinigten Sporocystensuspensionen mit Trypsin

Wurden die gefilterten Sporocysten nach Zusatz von 0,2 % Trypsin bei 39⁰ C inkubiert (diese Temperatur wurde gewählt, weil sie der normalen Körpertemperatur des Kaninchens entspricht), so waren die Ergebnisse ähnlich wie bei Verwendung von nicht gereinigten Suspensionen.

Nach 30 bis 60 Minuten hatten maximal 50 bis 60 % der Sporozoiten excystiert. Es war aber eine bessere Beobachtung der Sporozoiten gewährleistet, da viele störende Partikel durch das Filtern beseitigt worden waren..

Zur Verbesserung des Durchlaufs durch die Glasperlen- oder Wattersäulen wurden die zermörserten Oocysten vor der Filtration in wesentlich größeren Mengen physiologischer Kochsalzlösung als bisher aufgeschwemmt, z.B. ca. 100 ml zu einem etwa erbsengroßen Klumpen zerriebener Oocysten. Dadurch ging der Durchfluß erheblich schneller von statten, und eine Verstopfung entstand nicht so bald. Außerdem war die ausfließende Sporocystensuspension viel klarer als bisher; sie wurde in Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Sporocysten wurden dann durch 2 Minuten langes Zentrifugieren bei ca. 1500 g angereichert. Danach befanden sich im Überstand so gut wie keine Sporocysten mehr, und er wurde abgegossen. Nach Bedarf wurde mit physiologischer Kochsalzlösung nochmals zentrifugiert, um eine noch klarere Suspension zu erhalten.

Nach Zusatz von 0,2 % Trypsin und Inkubation bei 39° C waren jedoch die ohnehin bisher nicht sehr befriedigenden Excystationsergebnisse noch wesentlich schlechter, gleichgültig ob Watte oder Glasperlen zu Filtration der reichlich verdünnten Oocystensuspensionen verwendet worden waren. Es excystierten im besten Fall 5 % der Sporozoiten nach 1 bis 5 Stunden (siehe auch Versuch 2).

Da zunächst nicht klar war, ob als Ursache für diese niedrigen Excystationsraten die Zentrifugation der Sporocysten oder die starke Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung in Frage kamen, wurden folgende Untersuchungen vorgenommen:

Die zermörserten Oocysten wurden in nur wenigen ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und gefiltert. Die gereinigte Sporocystensuspension wurde 2 Minuten lang bei 1500 g zentrifugiert, der Bodensatz danach im gleichen Überstand wieder aufgewirbelt. Nach Zusatz von 0,2 % Trypsin excystierten nach einer Stunde Inkubation bei 39° C etwa 50 % der Sporozoiten. Wurde jedoch zu der nur wenig verdünnten

Suspension nach dem Filtern reichlich physiologische Kochsalzlösung gegeben, abzentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes das Zentrifugat in einigen ml 0,2 %iger Trypsinlösung suspendiert, so fand auch nach 5 Stunden bei 39° C keine oder nur unbedeutende Excystation statt.

Je mehr also die Sporocystensuspension vor oder nach dem Filtern mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde und je reiner sie dadurch war, desto niedriger war die Excystationsrates bei 39° C mit 0,2 % Trypsin.

Aus diesem Grund wurde dazu übergegangen, neben Trypsin entgegen der Versuchsanordnung von ROSE (1959) auch Galle im Excystationsmedium einzusetzen.

Vorversuche zur Excystation aus gereinigten Sporocystensuspensionen mit Trypsin und Galle

Da die meisten Autoren stets Galle vom Wirtstier der entsprechenden Eimeria - Art benutzten, wurde zunächst die Wirksamkeit von Kaninchengalle erprobt. In Konzentrationen von 2, 4, 6, 8 und 10 ‰ wurde Kaninchengalle zu physiologischer Kochsalzlösung mit 0,2 ‰ Trypsin gegeben. Bei Inkubation von gefilterten Sporocysten in diesen Medien bei 39° C erwiesen sich Gallekonzentrationen von 8 und 10 ‰ am wirksamsten. Nach 15 Minuten hatten bereits die meisten Sporozoitien excystiert, nach 30 Minuten war ein maximaler Prozentsatz von 95 ‰ erreicht. Es wurde festgestellt, daß diejenigen Sporozoitien, die nach dieser Zeit noch nicht frei waren, auch nach längerer Inkubationszeit nicht ausküllpten.

Außer Kaninchengalle wurde auch Galle vom Rind, Kalb und Schwein eingesetzt. Diese Gallearten führten ebenfalls, in einer Konzentration von 8 ‰ - zusammen mit 0,2 ‰ Trypsin - zu den gleichen Ergebnissen wie Kaninchengalle. Andere Konzentrationen wurden nicht erprobt. In allen folgenden Versuchen wurde von nun an im Excystationsmedium neben Trypsin immer Rindergalle verwendet, da sie aus dem naheliegenden Schlachthof einfach und in größeren Mengen zu besorgen war.

Vorversuche zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Sporozoiten nach Anfärbbarkeit

Zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Sporozoiten wurden in Anlehnung an die Färbungsmethoden von DORAN (1969) und WAGENBACH (1969) folgende Versuche durchgeführt:

1 %ige Farblösungen von Nigrosin, Trypanblau und Methylenblau wurden hergestellt, einmal mit Ringerlösung, einmal mit physiologischer Kochsalzlösung und einmal mit Aqua dest. Um festzustellen, ob sich lebende und tote Sporozoiten unterschiedlich färben, wurden Suspensionen von excystierten Sporozoiten in Ringerlösung und in physiologischer Kochsalzlösung verwendet, in denen sich zum Teil normal aussehende und bewegliche, zum Teil pathologisch veränderte und unbewegliche Sporozoiten befanden.

Die Sporozoitensuspensionen wurden im Verhältnis 3 : 1; 2 : 1; 1 : 1; 1 : 2 und 1 : 3 mit den verschiedenen Farblösungen gemischt und mikroskopisch untersucht. Bei keinem dieser Mischverhältnisse kam es zu einer Färbung, weder bei morphologisch normal aussehenden noch bei pathologisch veränderten Sporozoiten.

Weiterhin wurden einige Proben dieser Sporozoitensuspensionen abzentrifugiert und danach zum Bodensatz 1 %iges Trypanblau, Nigrosin und Methylenblau in Ringerlösung oder in physiologischer Kochsalzlösung gegeben. In 1 %iger Methylenblaulösung erhielten viele Sporozoiten, normal aussehende wie pathologisch veränderte, eine blauviolette Farbe. Dagegen wurde bei keinem der Sporozoiten in den beiden anderen Farblösungen eine Färbung festgestellt.

2.) Endgültige Versuchsanordnung und -durchführung

Aus diesen Vorversuchen ergaben sich folgende Standardverfahren zur Excystation und Durchführung der Einzelversuche:

1. Auswaschen der Oocysten von Kaliumbichromat
2. "Trockenes" Zermörsern der Oocysten
3. Verdünnung der zerriebenen Oocysten mit reichlich physiol. Kochsalzlösung

4. Reinigung der Suspension durch Watte
5. Anreicherung der gefilterten Sporocysten durch 2 Minuten langes Zentrifugieren bei 1500 g
6. Abgießen des Überstandes
7. Erneutes Suspendieren der Sporocysten in physiol. Kochsalzlösung
8. Zusatz von 0,2 % Trypsin
9. Zusatz von 8 % Rindergalle
10. Inkubation im Brutschrank bei 39° C 30 Minuten lang
11. Auswaschen der excystierten Sporozoiten mit physiol. Kochsalzlg. durch 3 maliges Zentrifugieren bei 1500 g, jeweils 3 Minuten lang; nach jedem Zentrifugieren Abpipettieren des sporozoitenfreien Überstandes
12. Zusatz des betreffenden Mediums, in dem die Lebensfähigkeit der Sporozoiten getestet werden soll

Bei sämtlichen Versuchen wurden die verschiedenen Medien mit den Sporocysten oder Sporozoiten in geschlossenen Plastikgefäßen aufbewahrt. Zur Untersuchung wurden mit einer Pipette ein oder zwei Tropfen entnommen und auf einen Objektträger gebracht. Nach leichtem Aufsetzen eines Deckgläschens wurden die Proben unterm Mikroskop bei Objektivergrößerungen von 10 : 1 und 45 : 1 untersucht. Das Mikroskop war mit einem Wärmetisch ausgerüstet, der in sämtlichen Versuchen auf 39° C eingestellt wurde.

In allen Versuchen, die bei 39° C oder bei höheren Temperaturen durchgeführt wurden, wurden die Sporocysten oder Sporozoiten - soweit nicht anders erwähnt - in den jeweiligen Medien bei Zimmertemperatur suspendiert und erst dann in den auf die entsprechende Temperatur eingestellten Brutschrank (Ehret - Elektro - Brutschrank, Typ BS Nr. III) gebracht. Die folgende Tabelle gibt an, innerhalb welcher Zeit die inkubierten Medien bei einer Anfangstemperatur von ca. 24° C die jeweils im Brutschrank vorhandene Endtemperatur erreichten.

Tabelle 2

Anstieg der Temperatur in den Inkubationsmedien nach Verbringen in den Brutschrank, in Abhängigkeit von der Zeit.
Ausgangstemperatur = ca. 24⁰ C

Zeit in Minuten	Endtemperatur			
	39 ⁰ C	50 ⁰ C	60 ⁰ C	70 ⁰ C
5	33	38	45	52
10	37	44	53	60
15	38	46	55	65
20	39	48	56	67
30		50	58	68
40			60	70
	⁰ C	⁰ C	⁰ C	⁰ C

Falls bei einzelnen Versuchen nichts anderes angegeben wird, wurden stets Sporocysten oder Sporozoiten aus einer 1 Monat alten Oocystenkultur verwendet.

Unter dem Begriff Excystationmedium ist im folgenden Text physiologische Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,2 % Trypsin und 8 % Rinder- galle zu verstehen.

Mit Sporocysten sind immer gefilterte, durch Zentrifugation angereicherte und - falls nicht anders angegeben - in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Sporocysten gemeint.

In den verschiedenen Versuchen zur Resistenzbestimmung von Sporozoiten wurden, wenn keine anderen Angaben gemacht werden, stets frisch excystierte Sporozoiten verwendet, die nach 30 Minuten langer Inkubation bei 39⁰ C im Excystationmedium mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen wurden.

Die in den verschiedenen Versuchen benutzten Medien hatten folgende pH Werte:

Aqua dest.	5,8
Leitungswasser	7,6

Rindergalle (unverdünnt)	7, 8
PBS	6, 9
0,1 bis 5,0 %ige Kochsalzlösung	5,5-5,7
Physiologische Kochsalzlösung	5,7
0,1 bis 10,0 % Trypsin in physiol. Kochsalzlg.	4,8-4,2
0,2 % Trypsin in physiol. Kochsalzlg.	4,7
8 % Rindergalle in physiol. Kochsalzlg.	7,4
0,2 % Trypsin + 2 bis 10 % Rindergalle in physiol. Kochsalzlg.	6,9-7,1
Excystationmedium	7,0-7,1
0,2 % Trypsin + 8 % Rindergalle in 0,9 bis 5,0 %iger Kochsalzlg.	7,0-6,8
0,2 % Trypsin + 8 % Rindergalle + 2,0 bis 0,05 % Ka- liumbichromat in physiol. Kochsalzlg.	6,0-6,9
2,0 bis 0,0008 % Kaliumbichromat in physiol. Kochsalzlg.	4,0-5,6
4,0 bis 0,005 % Kaliumbichromat in Aqua dest.	3,9-4,5
Serum	7,4-7,7
Zellkulturmedium	7,4
TC 199 (Difco)	7,4
TC 199 (Difco) mit 2 % Antibiotika - Lösung	7,0
Antibiotika - Lösung	6,6

In den angegebenen Konzentrationsbereichen war der Verlauf der pH Werte in der angegebenen Weise nahezu geradlinig direkt bzw. umgekehrt proportional dem Konzentrationsbereich.

Auf Grund der Ergebnisse in Versuch 1 konnte auf eine genauere Einstellung des pH Wertes des Excystationmedium mit dem pH-Meter verzichtet werden, da der gemessene Wert nach Zusatz von 0,2 % Trypsin und 8 % Galle zu physiologischer Kochsalzlösung stets bei pH 7 lag.

Ebenso erschien es berechtigt, im Hinblick auf die Ergebnisse in Versuch 21 mit physiologischer Kochsalzlösung ohne genauere Einstellung des pH Wertes zu arbeiten. Ist im folgenden Text von physiologischer Kochsalzlösung die Rede, so hat diese stets den "Normalwert"

von pH 5,7, wenn nicht ausdrücklich andere Angaben gemacht werden.

Auswertungskriterien

1. Das Ergebnis der Excystation, im folgenden Text auch als Excystationrate bezeichnet, wurde durch Berechnung des Prozentsatzes der excystierten Sporozoiten (PE) festgestellt.

Da nach den Ergebnissen der Färbeversuche eine Differenzierung von lebenden und toten Sporozoiten nicht in Frage kam, wurde eine Beurteilung der Lebensfähigkeit nach der Beweglichkeit der Sporozoiten und ihrem morphologischen Aussehen vorgenommen. Die Motilität wurde in den meisten Versuchen allmählich geringer und erlosch meist schon zu einem Zeitpunkt, zu dem noch über die Hälfte der Sporozoiten morphologisch unverändert schien. Aus diesem Grund wurden Morphologie und Bewegung getrennt beurteilt.

2. Morphologie (M)

Es wurden jeweils Sporozoiten als morphologisch normal und pathologisch verändert differenziert und der Wert als Prozentsatz angegeben (M - Wert). M = 70 heißt zum Beispiel : 70 % der Sporozoiten morphologisch normal, 30 % pathologisch verändert.

Die Auszählungen in den einzelnen Versuchen erfolgten ohne Berücksichtigung der Dichte; daher sind alle Werte relativ, die bei Dichte $D = 4$ (siehe unten) erzielten Werte jedoch gleichzeitig absolut.

3. Die Beweglichkeit der Sporozoiten wurde als Bewegungsrate (BR) in 6 Stufen eingeteilt:

BR = 5 alle Sporozoiten bewegen sich; Fortbewegung überwiegt

BR = 4 alle Sporozoiten bewegen sich; zum Teil Fortbewegung, zum Teil Bewegung am Ort

BR = 3 nicht alle Sporozoiten bewegen sich; einige verharren auch bei längerer Beobachtung in Ruhestellung. Die anderen bewegen sich, aber Bewegung am Ort überwiegt.

BR = 2 etwa die Hälfte der Sporozoiten ist bewegungslos. Der Rest zeigt überwiegend Bewegung am Ort und nur ganz vereinzelt Fortbewegung.

- BR = 1 die meisten Sporozoiten sind bewegungslos; nur ganz vereinzelt sind träge Beugebewegungen festzustellen.
- BR = 0 alle Sporozoiten sind bewegungslos.

Die geschilderten Bewegungsvorgänge beziehen sich immer auf normal aussehende Sporozoiten. Falls bei pathologisch veränderten Sporozoiten Bewegung festgestellt wurde, wird dies jeweils gesondert erwähnt.

In einigen Medien machten sich Veränderungen in der Sporozoiten-dichte bemerkbar (morphologisch normal aussehende + pathologisch veränderte Sporozoiten + leere Sporozoitenhüllen); in anderen Versuchen wurden Lysis und Agglutination beobachtet. Diese drei Begriffe wurden ebenfalls in Stufen eingeteilt.

4. Die Dichte (D) wurde nur in den Versuchen berücksichtigt, in denen eine bemerkenswerte Abnahme auftrat. In den Versuchen, in denen keine Angaben über die Dichte gemacht wurden, hatte sich diese gar nicht oder nur unwesentlich verringert.

- D = 4 Dichte zu Beginn des Versuches
- D = 3 Verlust von ca. 25 % der Sporozoiten
- D = 2 Verlust von ca. 50 % der Sporozoiten
- D = 1 Verlust von ca. 75 % der Sporozoiten
- D = 0 keine Sporozoiten mehr sichtbar

5. Unter Lysis (L) werden hier alle Vorgänge verstanden, bei denen es zu einem plötzlichen oder allmählichen Austritt des gesamten Zellplasmas kam und nur die leere Sporozoitenhülle zurückblieb.

- L - keine Lysis
- L + Lysis bei ca. einem Drittel der Sporozoiten
- L + + Lysis bei ca. zwei Dritteln aller Sporozoiten
- L + + + Lysis bei sämtlichen Sporozoiten

6. Unter Agglutination (A) ist eine Verklebung von 2 bis 5 bis 10, manchmal bis zu 50 und mehr morphologisch normalen und beweglichen oder pathologisch veränderten und unbeweglichen Sporozoiten miteinander zu verstehen.

- A - keine Agglutination
- A + einzelne Sporozoitenklumpen

A + + viele Sporozoitenklumpen

A + + + fast alle Sporozoiten sind in einzelnen Klumpen zusammen-
geballt; nur wenige sind einzeln im Medium sichtbar.

Alle in den Versuchen angegebenen Werte sind Schätzwerte, die nach ausreichender Einarbeitungszeit wiederholten stichprobenartigen Auszählungen entsprachen. Eine genauere Differenzierung war in vielen Fällen infolge der rasch stattfindenden Veränderungen aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

3.) Spezielle Versuchsanordnung

Eine Übersicht über die verschiedenen Versuche gibt die folgende Zusammenstellung.

<u>A. Excystation</u>	Versuch Nr.
1. Physiologische Kochsalzlösung mit 0,2 % Trypsin und 8 % Galle (= ExcystationsmEDIUM) bei verschiedenen pH Werten	1
2. Trypsin und Galle jeweils einzeln	
a. 0,2 % Trypsin in physiol. Kochsalzlsg. bei verschiedenen pH Werten	2
b. 8 % Galle in physiol. Kochsalzlsg. bei verschiedenen pH Werten	3
c. unverdünnte Galle	4
3. Haltbarkeit von Trypsinlösung und Galle bei Aufbewahrung in Zimmertemperatur und bei + 4° C	5
4. Verschiedene Konzentrationen von Kaliumbichromat im Excystationsmedium	6
5. Excystation aus verschieden alten Oocysten in unterschiedlichen Kochsalzkonzentrationen	7
<u>B. Versuche mit Sporocysten</u>	
1. Aufbewahrung in Aqua dest. bei + 4° C	8
2. Aufbewahrung in physiologischer Kochsalzlösung bei + 4° C, Zimmertemperatur und 39° C	9

	Versuch Nr.
3. Aufbewahrung in physiologischer Kochsalzlösung mit Kaliumbichromat in verschiedenen Konzentrationen bei + 4° C	10
4. Eintrocknung	11
<u>C. Lebensdauer excystierter Sporozoitcn unter verschiedenen chemischen bzw. physikalischen Einflüssen</u>	
1. Excystationsmedium und dessen Bestandteile	
a. Excystationsmedium bei + 4°, 24° und 39° C	12
b. Physiol. Kochsalzlsq. mit Trypsin in verschiedenen Konzentrationen bei 39° C	13
c. Unverdünnte Galle bei 39° C	14
2. Verschiedene Kochsalzkonzentrationen	
a. 0 bis 3,0 %ige Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur nach normaler Excystation	15
b. 0,3 bis 3,0 %ige Kochsalzlösung bei 39° C nach normaler Excystation	16
c. 2,0 bis 5,0 %ige Kochsalzlösung bei 39° C nach Ex- cystation in höherprozentigen Kochsalzlösungen	17
d. 2,0 bis 5,0 %ige Kochsalzlösung bei 39° C nach nor- maler Excystation und anschließendem Trypsin - Galle - Zusatz	18
3. Verschiedene Kaliumbichromat - Konzentrationen	
a. gelöst in physiol. Kochsalzlsq. bei 39° C	19
b. gelöst in Aqua dest. bei 39° C	20
4. Verschiedene pH Werte	
a. pH 2,0 bis pH 12,0 in physiol. Kochsalzlsq. und PBS bei 39° C	21
b. pH 8,0 in physiol. Kochsalzlsq. und zwei verschie- denen Ringerlösungen bei 39° C	22
5. Verschiedene Temperaturen	
a. + 4°, 24° und 39° C	23
b. 50°, 60° und 70° C	24

	Versuch Nr.
6. Zentrifugation bei verschiedener relativer Zentrifugalbeschleunigung (g)	25
7. Eintrocknung	26
8. Serum und Medien, die Serum enthalten	
a. Serum von verschiedenen Kaninchen bei 39 ⁰ C	27
b. Serum von verschiedenen Tierarten bei 39 ⁰ C	28
c. Zellkulturmedium	
aa. Gesamtmedium bei 39 ⁰ C	29
bb. Einzelbestandteile des Zellkulturmediums bei 39 ⁰ C	30
cc. Grundsubstanz TC 199 (Difco) mit unterschiedlichem Serumzusatz bei 39 ⁰ C	31
9. Unterschiedliches Alter der Oocysten	32

A. Excystation

Auswertungskriterium war die jeweilige Excystationrate. Die ausgeschlüpften Sporozoiten sahen stets, wenn nicht anders erwähnt, morphologisch normal aus und waren gut beweglich.

In Versuch 2, 3 und 4 wurde zur Kontrolle nach einer bestimmten Inkubationszeit einem Teil der Proben der fehlende Excystationsteil (Trypsin bzw. Galle) zugesetzt.

Versuch 1 Wirkung des Excystationsmediums bei verschiedenen pH Werten und 39⁰ C (Tabelle 3)

Excystationsmedium wurde mit 1,0 N NaOH bzw. 1,0 N HCl auf jeweils um 0,5 ansteigende pH Werte von 4,5 bis 11,0 eingestellt und Sporocysten darin bei 39⁰ C inkubiert. Im Abstand von 30 Minuten erfolgten 5 Stunden lang Probenentnahmen.

Versuch 2 Wirkung von 0,2 %iger Trypsinlösung bei verschiedenen pH Werten und 39⁰ C

Physiologische Kochsalzlösung mit 0,2 % Trypsin - Zusatz wurde mit 1,0 N HCl bzw. 1,0 N NaOH auf jeweils um 0,5 ansteigende pH

Werte von pH 4,5 bis 9,5 eingestellt und Sporocysten darin bei 39° C inkubiert. Bis zur 5. Stunde wurden alle 30 Minuten Proben entnommen.

Versuch 3 Wirkung von 8 %iger Galle bei verschiedenen pH Werten und 39° C

Physiologische Kochsalzlösung mit Zusatz von 8 % Galle wurde mit 1,0 N HCl bzw. 1,0 N NaOH auf jeweils um 0,5 ansteigende pH Werte von pH 4,5 bis 10,0 eingestellt und Sporocysten darin bei 39° C inkubiert. (Tabelle 4). Im Abstand von 30 Minuten erfolgten bis zur 5. Stunde Probenentnahmen.

Versuch 4 Wirkung von unverdünnter Galle bei 39° C

Sporocysten wurden in unverdünnter Rindergalle bei 39° C inkubiert. Alle 30 Minuten wurden bis zur 5. Stunde Proben entnommen.

Versuch 5 Haltbarkeit von Trypsinlösung und Galle

Frische Rindergalle wurde im Kühlschrank bei + 4° C, frisch angesetzte 2 %ige Trypsinlösung bei + 4° C und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. 8 Wochen lang wurden alle 3 bis 4 Tage Proben entnommen. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach 10 und 12 Wochen.

Die Galle wurde in einer Konzentration von 8 % zu einer Sporocystensuspension mit 0,2 % frisch gelöstem Trypsin gegeben. Die 2 %ige Trypsinlösung wurde im Verhältnis 1 : 10 mit einer Sporocystensuspension gemischt, die 8 % frische oder maximal eine Woche alte Galle enthielt.

Die Proben wurden 30 Minuten lang im Brutschrank bei 39° C gehalten und danach untersucht. Als voll wirksam wurden die beiden Excystationbestandteile bezeichnet, wenn sie in Kombination miteinander bei 39° C nach 30 Minuten eine Excystation von PE = ca. 95 % hervorriefen.

Versuch 6 Excystation bei verschiedenen Konzentrationen von Kaliumbichromat

Sporocysten wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, die Kaliumbichromat in Konzentrationen von 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,1;

0,09; 0,08; 0,07; 0,06 und 0,05 ‰ enthielt (Tabelle 5). Nach Zusatz von 0,2 ‰ Trypsin und 8 ‰ Galle wurden die Medien bei 39° C inkubiert. Probenentnahmen erfolgten nach 30 Minuten, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden.

Versuch 7 Excystation aus Sporocysten verschieden alter Oocysten in Medien mit unterschiedlichen Kochsalz - Konzentrationen (siehe auch Versuch 17)

Sporocysten aus 1, 3, 6 und 12 Monate alten, bei + 4° C aufbewahrten Oocystenkulturen wurden in 0,9; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 und 5,0 ‰ iger Kochsalzlösung suspendiert (Tabelle 6). Nach Zusatz von 0,2 ‰ Trypsin und 8 ‰ Galle wurden die Medien bei 39° C inkubiert. Proben wurden alle 30 Minuten bis zur 3. Stunde entnommen.

B. Versuche mit Sporocysten

Auswertungskriterium war die jeweilige Excystationsrates. Die ausgeschlüpften Sporozoiten sahen stets, wenn nicht anders erwähnt, morphologisch normal aus und waren gut beweglich.

Versuch 8 Aufbewahrung von Sporocysten in Aqua dest. bei + 4° C

Sporocysten wurden nach dreimaligem Auswaschen der physiologischen Kochsalzlösung in Aqua dest. suspendiert und im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt. Innerhalb der ersten Woche wurden täglich, danach alle 2 bis 4 Tage bis zum Ablauf von 4 Wochen Proben entnommen (Tabelle 7). Dabei wurden die Sporocysten abzentrifugiert, nach Abpipettieren des überstehenden Aqua dest. in ExcystationsmEDIUM suspendiert und 30 Minuten lang bei 39° C inkubiert.

Versuch 9 Aufbewahrung von Sporocysten in physiologischer Kochsalzlösung bei + 4°, 24° und 39° C

Sporocysten wurden im Kühlschrank bei + 4° C, bei Zimmertemperatur (ca. 24° C) und im Brutschrank bei 39° C aufbewahrt. In der ersten Woche erfolgten täglich Probenentnahmen, danach alle 2 bis 4 Tage bis zur 4. Woche und schließlich nach 5, 6 und 7 Wochen (Tabelle 8). Die Sporocysten wurden dabei in ExcystationsmEDIUM bei 39° C 30 Mi-

nuten lang inkubiert.

Versuch 10 Aufbewahrung von Sporocysten in unterschiedlich konzentrierten Kaliumbichromat - Lösungen bei + 4⁰ C

Sporocysten wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, die Kaliumbichromat in Konzentrationen von 2,0; 1,0; 0,5; 0,1 und 0,05 % enthielt. Diese Medien wurden im Kühlschrank bei + 4⁰ C aufbewahrt. Nach 15 und 30 Minuten, dann nach 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden sowie nach 3 Tagen wurden jeweils Proben entnommen (Tabelle 9). Die Sporocysten wurden dabei dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, in ExcystationsmEDIUM suspendiert und 30 Minuten bei 39⁰ C inkubiert.

Versuch 11 Resistenz von Sporocysten gegen Eintrocknung

Jeweils ein Tropfen mit Sporocysten in physiologischer Kochsalzlösung und in Aqua dest. wurde auf einen Objektträger gebracht und bei Zimmertemperatur bzw. auf dem Heiztisch bei 39⁰ C stehen gelassen, bis er vollständig eingetrocknet war. Danach wurde jeweils ein Tropfen ExcystationsmEDIUM auf der eingetrockneten Masse verrührt, bis diese wieder gelöst war. Die darauf folgende Beobachtung erfolgte sowohl nach Auflage eines Deckglases, als auch am hängenden Tropfen.

C. Lebensdauer excystierter Sporozoiten unter verschiedenen chemischen bzw. physikalischen Einflüssen

In sämtlichen Versuchen (12 bis 32) wurden die Sporozoiten nach ihrer Morphologie (M - Wert) und Beweglichkeit (BR = Bewegungsrate) beurteilt. In den Versuchen 12 bis 18 wurden zusätzlich (zumindest teilweise) Veränderungen in der Sporozoitendichte (D = Dichte) registriert. Weitere Auswertungskriterien (L = Lysis und A = Agglutination) werden bei den jeweiligen Einzelversuchen erwähnt.

Die Versuche wurden in der Regel beendet, wenn entweder der M - Wert oder die Bewegungsrate den Nullpunkt erreicht hatten.

Die in den Versuchen 13 und 19 als Kontrollwert angegebenen Daten

für physiologische Kochsalzlösung wurden aus Versuch 16 übernommen.

1. ExcystationsmEDIUM und dessen Bestandteile

Versuch 12 Lebensfähigkeit von Sporozoiten im Excystationsmedium bei + 4⁰, 24⁰ und 39⁰ C (Tabelle 10)

Frisch ausgeschlüpfte Sporozoiten wurden im Excystationsmedium im Brutschrank bei 39⁰ C, bei Zimmertemperatur und im Kühlschrank bei + 4⁰ C aufbewahrt. Das Medium im Brutschrank wurde stündlich untersucht. Bei 24⁰ und 4⁰ C erfolgten alle 5 bzw. 12 Stunden Probenentnahmen.

Neben den oben aufgeführten Auswertungskriterien wurde auch Agglutination berücksichtigt. Im Gegensatz zu den folgenden Versuchen, (außer Versuch 14) wurde die Beobachtung erst beendet, wenn in allen Medien auch keine pathologisch veränderten Sporozoiten mehr vorhanden waren.

Versuch 13 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in unterschiedlich konzentrierten Trypsinlösungen bei 39⁰ C (Tabelle 11)

Sporozoiten wurden bei 39⁰ C in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert, die Trypsin in Konzentrationen von 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 und 10,0 % enthält. Probenentnahmen erfolgten direkt nach dem Kontakt der Sporozoiten mit den jeweiligen Medien, nach 10 und 30 Minuten sowie von der ersten Stunde an stündlich.

Versuch 14 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in unverdünnter Galle von verschiedenen Tierarten bei 39⁰ C (Tabelle 12)

Sporozoiten wurden in unverdünnter Kaninchen-, Schweine- und Rindergalle suspendiert und bei 39⁰ C inkubiert. Probenentnahmen erfolgten stündlich. Neben den oben aufgeführten Auswertungskriterien wurde die Agglutination berücksichtigt. Der Versuch wurde erst dann beendet, wenn die Dichte den Nullpunkt erreicht hatte.

2. Verschiedene Kochsalz - Konzentrationen

Versuch 15 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in Wasser sowie in 0,1

bis 3,0 %iger Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur
(Tabelle 13, 14 u. 15)

Sporozoitien wurden in Aqua dest., Leitungswasser und 0,1 bis 3,0 %igen Kochsalzlösungen - in Konzentrationsabständen von jeweils 0,1 % - suspendiert und bei Zimmertemperatur gehalten. Direkt nach Zugabe der Lösungen zu den Sporozoitien wurden Proben entnommen und jeweils 10 Minuten lang beobachtet. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach 10, 30 und 60 Minuten, danach stündlich und von der 5. Stunde an in Abständen von jeweils 5 Stunden.

Die Sporozoitien in 2,8; 2,9 und 3,0 %iger Kochsalzlösung wurden in einem Nebenversuch nach 5 Minuten, 1, 5 und 15 Stunden langer Einwirkungsdauer bei Zimmertemperatur abzentrifugiert und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Jeweils direkt danach wurden Proben entnommen. Als zusätzliches Auswertungskriterium diente die Lysis.

Versuch 16 Lebensfähigkeit von Sporozoitien in 0,3 bis 3,0 %iger Kochsalzlösung bei 39° C (Tabelle 16)

Sporozoitien wurden in Kochsalzlösungen von 0,3 bis 3,0 - in jeweils um 0,1 % zunehmenden Konzentrationen - bei 39° C inkubiert. Probenentnahmen erfolgten direkt nach Kontakt der Sporozoitien mit den betreffenden Medien, nach 30 und 60 Minuten sowie danach stündlich.

Nach 1 und 5 Stunden langer Inkubation wurden Kontrollproben der Sporozoitien in 2,8; 2,9 und 3,0 %iger Kochsalzlösung abzentrifugiert und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Jeweils direkt danach wurden die Proben untersucht.

Auf die Medien Aqua dest. sowie 0,1 und 0,2 %ige Kochsalzlösung (siehe Versuch 15) wurde hier verzichtet, da die Sporozoitien darin bereits bei Zimmertemperatur innerhalb kurzer Zeit zugrunde gingen. Als zusätzliches Auswertungskriterium diente die Lysis.

Versuch 17 Lebensfähigkeit von Sporozoitien in 2,0 bis 5,0 %iger Kochsalzlösung bei 39° C nach Excystation in den gleichen Lösungen (Tabelle 17)

Sporocysten wurden in 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 und 5,0 %iger Kochsalzlösung jeweils mit 0,2 % Trypsin und 8 % Galle bei 39° C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Excystationrate bestimmt, von jeder Probe ein Teil entnommen, mit Kochsalzlösung der gleichen Konzentration dreimal ausgewaschen, darin suspendiert und weiter bei 39° C inkubiert.

Die Untersuchung erfolgte bei den ausgewaschenen Proben jeweils im Anschluß an diese Behandlung sowie bei beiden Teilproben - ausgewaschene und nicht ausgewaschene - danach in stündlichen Abständen bis zur 6. Stunde.

Versuch 18 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in 2,0 bis 5,0 %iger Kochsalzlösung bei 39° C nach normaler Excystation und anschließendem Trypsin - Galle - Zusatz (Tabelle 18)

Sporozoiten, die im üblichen ExcystationsmEDIUM excystiert hatten, wurden nach Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung in 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 und 5,0 %iger Kochsalzlösung suspendiert und bei 39° C inkubiert. Nach einer Stunde wurde jede Probe geteilt und der einen Hälfte 0,2 % Trypsin und 8 % Galle zugegeben. Beide Proben wurden weiter bei 39° C inkubiert. Die Untersuchung erfolgte unmittelbar nach dem Kontakt der Sporozoiten mit den Kochsalzlösungen, nach 30 Minuten und einer Stunde, unmittelbar nach Zusatz der Trypsin - Galle - Mischung und weiter in stündlichen Abständen bis zur 6. Stunde.

3. Kaliumbichromat

Versuch 19 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung mit unterschiedlichen Kaliumbichromat - Konzentrationen bei 39° C (Tabelle 19)

Sporozoiten wurden in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von Kaliumbichromat in einer Verdünnungsreihe von 2,0 bis 0,0008 % (siehe Tabelle 19) suspendiert und bei 39° C inkubiert. Untersuchungen wurden unmittelbar nach Zugabe der Medien zu den Sporozoiten jeweils 10 Minuten lang vorgenommen. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach

10 und 30 Minuten und von der 1. bis zur 15. Stunde jeweils stündlich.

Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde von den Medien mit 0,01 bis 2,0 % Kaliumbichromat ein Teil entnommen, dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und unmittelbar danach untersucht. Als zusätzliches Auswertungskriterium diente die Agglutination.

Versuch 20 Reaktion von Sporozoiten in Aqua dest. mit verschiedenen Kaliumbichromat - Konzentrationen bei 39° C

Sporozoiten wurden in Aqua dest. mit Zusätzen von 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 und 0,005 % Kaliumbichromat suspendiert und bei 39° C inkubiert. Zur Feststellung, von welcher Konzentration an sich die gleichen Vorgänge wie in reinem Aqua dest. abspielten, wurden die Sporozoiten direkt nach Kontakt mit den jeweiligen Lösungen 10 Minuten lang beobachtet. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach 10, 30 und 60 Minuten.

Als zusätzliches Auswertungskriterium diente die Lysis.

4. Verschiedene pH Werte

Versuch 21 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung und PBS bei unterschiedlichen pH Werten und 39° C (Tabelle 20)

Sporozoiten wurden in einer Versuchsreihe in physiologischer Kochsalzlösung, in einer anderen Reihe in PBS suspendiert. Diese Medien wurden mit 0,1 oder 1,0 N HCl bzw. NaOH auf jeweils um 1,0 ansteigende pH Werte von pH 2,0 bis 12,0 eingestellt. Zur Kontrolle wurde bei einer Probe mit physiologischer Kochsalzlösung der Normalwert von pH 5,7 beibehalten. Sämtliche Medien wurden bei 39° C inkubiert. Probenentnahmen erfolgten unmittelbar nach Kontakt der Sporozoiten mit den jeweiligen Lösungen, nach 30 und 60 Minuten und weiter in stündlichen Abständen.

Als zusätzliches Auswertungskriterium diente die Lysis.

Versuch 22 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung und zwei Ringerlösungen verschiedener Zusammen-

setzung bei pH 8 und 39° C (Tabelle 21)

Sporozoitcn wurden in drei verschiedenen Medien bei 39° C inkubiert, die mit 1,0 N NaOH bzw. HCl in Analogie zu dem von WAGENBACH (1969) angegebenen pH Wert auf pH 8,0 eingestellt worden waren.

Medium 1 Physiologische Kochsalzlösung

Medium 2 Ringerlösung I (nach WAGENBACH, 1969)

pro 1000 ccm Aqua dest.:

NaCl	9,0 g
CaCl ₂	0,24 g
KCl	0,42 g
KHCO ₃	0,20 g
Tris (hydroxymethyl)- aminomethan	3,03 g

Medium 3 Ringerlösung II (nach ROMEIS, 1948)

pro 1000 ccm Aqua dest.:

NaCl	9,0 g
CaCl ₂	0,25 g
KCl	0,42 g

Die Probenentnahmen erfolgten stündlich.

5. Verschiedene Temperaturen

Versuch 23 Lebensfähigkeit von Sporozoiten bei + 4°, 24° und 39° C
(Tabelle 22)

Sporozoiten wurden bei Zimmertemperatur in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und im Kühlschrank bei + 4° C, bei Zimmertemperatur (ca. 24° C) sowie im Brutschrank bei 39° C aufbewahrt. Die Probenentnahmen erfolgten bei 4° C täglich, bei 24° C alle 5 Stunden und bei 39° C stündlich.

Versuch 24 Lebensfähigkeit von Sporozoiten bei 50°, 60° und 70° C
(Tabelle 23)

Sporozoiten wurden bei Zimmertemperatur in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und im Brutschrank bei 50°, 60° und 70° aufbe-

wahrt. Proben wurden sofort auf dem auf die entsprechende Temperatur eingestellten Wärmetisch untersucht. Weitere Probenentnahmen erfolgten im Abstand von 5 bis 10 Minuten.

In einem Nebenversuch wurden die Sporozoiten in auf 50⁰, 60⁰ und 70⁰ C vorgewärmter physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und weiter bei denselben Temperaturen gehalten. Probenentnahmen erfolgten sofort nach Zugabe der vorgewärmten Medien sowie im Abstand von 5 bis 10 Minuten.

6. Zentrifugation

Versuch 25 Resistenz von Sporozoiten gegen Zentrifugation bei unterschiedlich hoher relativer Zentrifugalbeschleunigung (g) bei Zimmertemperatur (Tabelle 24 u. 25)

Sporozoiten wurden bei 2.000; 5.000; 10.000; 30.000; 50.000; 100.000; 150.000 und 200.000 g jeweils 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur zentrifugiert (ohne An- und Auslaufzeit). Im Anschluß daran wurde das Zentrifugat in der überstehenden physiologischen Kochsalzlösung mit einer Pipette aufgewirbelt und eine Probe entnommen. Der Rest wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und in 12 - stündigen Abständen weiter untersucht. Die Sporozoiten, die das Zentrifugieren nicht überstanden hatten, wurden dabei mitgezählt, weil sie meist von den anderen, erst später zugrunde gegangenen morphologisch nicht zu unterscheiden waren. Als Kontrolle dienten excystierte und in der üblichen Weise ausgewaschene Sporozoiten.

Bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 2.000; 5.000; 10.000 und 30.000 g wurde außerdem eine, eineinhalb und zwei Stunden lang zentrifugiert und danach jeweils eine Probe entnommen.

Zur Verfügung standen eine Christ-Zentrifuge, Typ UJ1S (2.000 u. 5.000 g), eine Phywe - Zentrifuge, Typ Nr. 1049, mit Wasserkühlung (10.000 u. 30.000 g) sowie eine Beckmann - Ultrazentrifuge, Typ Sphingo L-2 (50.000 bis 200.000 g).

7. Eintrocknung

Versuch 26 Resistenz von Sporozoiten gegen Eintrocknung

Ein Tropfen mit Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung wurde auf einen Objektträger gebracht und bei Zimmertemperatur so lange stehen gelassen, bis er vollständig eingetrocknet war. Die eingetrocknete Masse wurde mikroskopisch untersucht und danach durch vorsichtiges Rühren mit einer Pipette in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Nach Auflage eines Deckgläschens erfolgte erneute mikroskopische Untersuchung.

8. Serum und Medien, die Serum enthalten

In den Versuchen 27 bis 31 dienten als zusätzliche Auswertungskriterien Lysis und Agglutination.

Versuch 27 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in Serum verschiedener Kaninchen bei 39⁰ C (Tabelle 26)

Sporozoiten wurden in folgenden Seren suspendiert und bei 39⁰ C inkubiert:

in unbehandeltem (1) und in inaktiviertem Normalserum (2) von Kaninchen aus einem SPF - Bestand (insbesondere pasteurellose- und kokzidiosefrei) ⁺⁾ ;

in unbehandeltem Serum von einem ca. 6 Wochen alten Kaninchen am 12. Tage nach Infektion mit E. stiedai (3);

in unbehandeltem Serum von einem ca. 8 Wochen alten Kaninchen, das sich bei der Sektion als frei von E. stiedai erwies (4), jedoch von einer starken Darmkokzidiose befallen war;

in unbehandeltem (5), inaktiviertem (6) sowie in mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 3 verdünntem (7) Immunserum von ca. 6 Monate alten Kaninchen, die von einem Alter von 6 Wochen an wiederholt mit E. stiedai infiziert worden waren.

⁺⁾ Für die Überlassung dieses Serums sei der Fa. Dr. K. Thomae, Biberach/Riß herzlich gedankt.

Die Serumgewinnung erfolgte nach Blutentnahme aus der Ohrvene oder nach Schlachtung durch 15 bis 20 Minuten lange Zentrifugation des Blutes bei 2.000 g. Zur Inaktivierung wurde das Serum 30 Minuten lang bei 58° C erhitzt.

Unmittelbar nach Kontakt der Sporozoiten mit den Seren wurden Proben entnommen und 10 Minuten lang beobachtet. Weitere Untersuchungen erfolgten nach 10; 15; 20; 30 und 60 Minuten sowie stündlich bis zur 5. Stunde.

Versuch 28 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in Serum verschiedener Tierarten bei 39° C (Tabelle 27)

Untersucht wurde Serum von Pferd, Kuh, Kalb, Schaf, Ziege, Schwein, Hund, Ratte, Maus und Küken. Die Blutentnahme erfolgte intravenös, bzw. bei Ratte und Maus durch Punktion des retrobulbären Venenplexus, bei Küken nach Dekapitation. Die Serumgewinnung erfolgte wie in Versuch 27. Sporozoiten wurden in diesen Seren bei 39° C inkubiert und direkt sowie im Abstand von wenigen Minuten (siehe Tabelle 27) untersucht.

Versuch 29 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in einem Zellkulturmedium bei 39° C (Tabelle 28)

Sporozoiten wurden bei 39° C in einem Zellkulturmedium folgender Zusammensetzung inkubiert:

80 %	TC 199 (Difco)
5 %	fetales Kälberserum
10 %	inaktiviertes Kälberserum
5 %	inaktiviertes Kaninchenserum
2 %	antibiotische Lösung (1 g Streptomycin + 1.000.000 IE Penicillin pro 100,0 ml PBS)

Sofort nach Kontakt der Sporozoiten mit dem Medium wurde eine Probe entnommen und 10 Minuten lang beobachtet. Weitere Untersuchungen erfolgten nach 10, 20, 30 und 60 Minuten, von da an stündlich bis zur 8. Stunde.

Versuch 30 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in einzelnen Bestandteilen des Zellkulturmediums bei 39° C (Tabelle 28)

Sporozoiten wurden in TC 199 mit und ohne antibiotische Lösung, in unverdünnter Antibiotika - Lösung, weiter jeweils in unverdünntem fetalen und inaktivierten Kälberserum sowie in inaktiviertem Kaninchenserum suspendiert und bei 39⁰ C inkubiert. Unmittelbar nach Kontakt der Sporozoiten mit den jeweiligen Medien wurden Proben entnommen und 10 Minuten lang beobachtet. Weitere Untersuchungen erfolgten nach 10, 20, 30 und 60 Minuten, von da an stündlich bis zur 8. Stunde.

Versuch 31 Lebensfähigkeit von Sporozoiten in TC 199 (Difco) mit je einem oder zwei der im Zellkulturmedium enthaltenen Seren in unterschiedlichen Konzentrationen bei 39⁰ C (Tabelle 29)

Die in dem Zellkulturmedium enthaltenen Seren wurden zunächst in ihrer ursprünglichen Konzentration im Grundsubstrat TC 199 getestet: 5 % fetales Kälberserum; 10 % inaktiviertes Kälberserum sowie 5 % inaktiviertes Kaninchenserum. Weiter wurden beide Kälberseren in Kombination miteinander und in der ursprünglichen Konzentration (5 % fetales + 10 % inaktiviertes) mit TC 199 vermischt.

Da das Zellkulturmedium insgesamt 20 % Serum enthielt, wurden die einzelnen Seren, jeweils in der gleichen Konzentration, nochmals verwendet (jeweils 20 % fetales Kälberserum, inaktiviertes Kälber- und Kaninchenserum in TC 199).

In diesen Medien wurden die Sporozoiten suspendiert und bei 39⁰ C inkubiert. Probenentnahmen erfolgten sofort nach dem Kontakt, nach 10, 20, 30 und 60 Minuten sowie stündlich bis zur 8. Stunde.

9. Unterschiedliches Alter der Oocysten

Versuch 32 Lebensfähigkeit von Sporozoiten aus unterschiedlich alten Oocysten in physiologischer Kochsalzlösung bei 39⁰ C (Tabelle 30)

Sporozoiten aus Oocysten, die 1, 3, 6 und 12 Monate lang bei + 4⁰ C aufbewahrt worden waren, wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und bei 39⁰ C inkubiert. Probenentnahmen erfolgten stündlich.

IV. ERGEBNISSE

A. Excystation

Versuch 1 Sporocysten wurden bei 39⁰ C in ExcystationsmEDIUM bei unterschiedlichen pH Werten inkubiert (Tabelle 3).

Die nach 30 Minuten in allen Medien erreichten Excystationsraten veränderten sich im weiteren Verlauf des Versuches nicht mehr.

Bei pH 4,5 kam es zu keiner Excystation. Bei pH 5,0 schlüpfen erstmals Sporozoiten aus, jedoch waren es nicht mehr als 10 %. Im pH Bereich zwischen 5,5 und 8,5 wurden mit 90 bis 95 % excystierten Sporozoiten die höchsten Werte erreicht. Bei den nächst höheren pH Werten wurden allmählich niedriger werdende Excystationsraten festgestellt. So waren bei pH Werten von 9,0 und 9,5 75 bzw. 60 % freie Sporozoiten zu beobachten. In den auf pH 10,0 und 10,5 eingestellten Medien waren von den 40 bzw. 50 % excystierten Sporozoiten nach 30 Minuten einige pathologisch verändert und unbeweglich (siehe Versuch 21). Bei einem pH Wert von 11,0 kam es zu keiner Excystation.

Tabelle 3

Excystationsergebnisse in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,2 % Trypsin und 8 % Galle bei verschiedenen pH Werten und 39⁰ C.

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten nach 30 Minuten (siehe S. 27)

pH	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0	10,5	11,0
PE	0	10	90	95	95	95	95	95	90	75	60	50	40	0

Versuch 2 Sporocysten wurden in 0,2 %iger Trypsinlösung bei unterschiedlichen pH Werten und 39⁰ C inkubiert.

Im Verlauf von 5 Stunden kam es bei einem pH Wert von 4,5 zu keiner Excystation. In den anderen, auf pH Werte zwischen 5,0 und 9,5 eingestellten Medien wurden nur ganz vereinzelt freie Sporozoiten

beobachtet. Im besten Fall waren es ca. 5 %.

Zur Kontrolle wurde von jedem Medium, nachdem es etwa eine halbe Stunde im Brutschrank gestanden hatte, ein Teil entnommen und 8 % Rindergalle zugesetzt. Innerhalb der nächsten 15 bis 20 Minuten hatten bei 39⁰ C fast alle Sporozoiten excystiert.

Versuch 3 Sporocysten wurden in 8 %iger Galle bei unterschiedlichen pH Werten und 39⁰ C inkubiert (Tabelle 4).

In den pH Bereichen von 4,5; 5,0; 5,5 und 6,0 kam es innerhalb von 5 Stunden zu keiner Excystation. Bei pH 6,5 hatten nach 2 Stunden 10 % der Sporozoiten excystiert. Dieser Wert stieg bis zur 3. Stunde allmählich auf 40 % an und erhöhte sich auch nach längerer Inkubation nicht mehr. Bei den pH Werten von 7,0 und 7,5 hatten im Verlauf von 2 bis 3 Stunden mit 95 % fast alle Sporozoiten excystiert. Die ersten freien Sporozoiten waren in diesen Medien nach 1 bis 1,5 Stunden zu sehen. Jeweils eine halbe Stunde später waren schon 50 bis 60 % ausgeschlüpft. Eine geringere und teilweise verzögerte Excystation fand bei den pH Werten 8,0; 8,5 und 9,0 statt. Bei pH 9,5 wurden bis zur 2. Stunde keine, nach 2,5 Stunden 5 % und nach 4 und 5 Stunden 10 % freie Sporozoiten beobachtet. In dem Medium mit pH 10,0 fand innerhalb von 5 Stunden keine Excystation statt.

Bei den jeweiligen Kontrollproben, denen nach 30 Minuten langer Inkubation 0,2 % Trypsin zugesetzt wurde, kam es innerhalb weiterer 15 bis 20 Minuten bei 39⁰ C zu Excystationsraten von ca. 95 %.

Tabelle 4

Excystationsergebnisse in physiologischer Kochsalzlösung mit 8 % Galle - Zusatz bei unterschiedlichen pH Werten und 39⁰ C in Abhängigkeit von der Zeit (t).

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten (siehe S. 27).

pH \ t	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h	5 h
4,5	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,5	0	0	0	0	0	0	0	0
6,0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,5	0	0	0	10	20	40	40	40
7,0	0	0	5	60	70	95	95	95
7,5	0	5	50	95	95	95	95	95
8,0	0	0	5	40	70	70	70	70
8,5	0	0	5	10	40	50	50	50
9,0	0	0	0	5	10	40	40	40
9,5	0	0	0	0	5	5	10	10
10,0	0	0	0	0	0	0	0	0

Versuch 4 Sporocysten wurden in unverdünnter Galle bei 39⁰ C inkubiert.

Nach einer Stunde waren die ersten freien Sporozoiten (5 bis 10 %) zu sehen. Nach 5 Stunden hatten 40 % excystiert.

Wurde der Galle nach 30 Minuten langer Inkubation 0,2 % Trypsin zugesetzt, so excystierten innerhalb von weiteren 15 Minuten bei 39⁰ C ca. 95 % der Sporozoiten.

Versuch 5 Sporocysten wurden in Trypsinlösung und Galle unterschiedlichen Alters bei 39⁰ C inkubiert.

Rindergalle war nach 8 Wochen in der stets verwendeten Konzentration von 8 % noch voll wirksam, obwohl nach 4 Wochen allmählich zunehmende Geruchsabweichungen und Trübung auftraten. Die bei + 4⁰ C

aufbewahrte Trypsinlösung zeigte ebenfalls bis zur 8. Woche eine gleichbleibende Wirkung, trotz Trübung und Flockenbildung, die nach 3 Wochen langer Lagerung allmählich auftraten. Auch nach 10 und 12 Wochen wurde bei einer Kombination der beiden aufbewahrten, makroskopisch und geruchlich stark veränderten Lösungen miteinander noch eine Excystation von etwa 95 % erzielt.

Die bei Zimmertemperatur aufbewahrte Trypsinlösung war 4 Wochen lang voll wirksam. Danach wurde der Versuch wegen zu starker Schimmelbildung und Geruchsabweichung, die seit dem 14. Tag auftraten, beendet.

Versuch 6 Sporocysten wurden in ExcystationsmEDIUM mit unterschiedlichen Kaliumbichromat - Zusätzen bei 39° C inkubiert (Tabelle 5)

Nach 30 Minuten waren in allen Medien die maximalen Excystationsraten erreicht. Sie verbesserten sich im Laufe der nächsten 5 Stunden nicht mehr.

Bei Zusätzen von 0,5 bis 2,0 % Kaliumbichromat fand keine Excystation statt. Erst bei 0,1 % waren 10 % freie Sporozoiten sichtbar. In den 0,09 und 0,08 %igen Kaliumbichromat - Medien excystierten 60 bis 85 %. Bei Konzentrationen von 0,07; 0,06 und 0,05 % wurden mit jeweils 95 % die höchsten Werte erreicht.

Bei der Untersuchung von Proben aus den Medien mit 0,1; 0,09 und 0,08 % Kaliumbichromat - Zusatz waren zahlreiche Sporocysten zu sehen, aus denen die Sporozoiten mehr oder weniger weit ausgeschlüpft und dabei "steckengeblieben" waren. Sie excystierten auch bei längerer Beobachtung nicht weiter. In sämtlichen Medien hörten die Sporozoiten nach Beendigung des Schlüpfvorgangs sofort auf sich zu bewegen (siehe auch Versuch 19).

Tabelle 5

Excystationsergebnisse in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,2 % Trypsin und 8 % Galle nach Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen bei 39° C.

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten nach 30 Minuten (siehe S. 27)

% K ₂ Cr ₂ O ₇	2,0	1,5	1,0	0,5	0,1	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05
PE	0	0	0	0	10	60	85	95	95	95

Versuch 7 Sporocysten aus verschiedenen alten Oocysten wurden in unterschiedlich konzentrierten Kochsalzlösungen mit Trypsin und Galle bei 39° C inkubiert (Tabelle 6).

Die nach 30 Minuten in allen Medien erreichten Excystationsraten veränderten sich im weiteren Verlauf des Versuches nicht mehr.

In physiologischer Kochsalzlösung und in den 1,5 bis 3,0 %igen Kochsalzmedien waren die Excystationsraten bei 1 bis 12 Monate alten Sporocysten mit 95 bis 80 % etwa gleich gut. In der 3,5 %igen Lösung war noch etwa die Hälfte aller 1 bis 6 Monate alten Sporozoiten in der Lage zu excystieren. Aus 12 Monate alten Sporocysten schlüpften nur noch 20 % der Sporozoiten. Bei 4,0 % Kochsalz - Zusatz zeigte sich eine deutliche Altersabhängigkeit. Aus 1, 3 und 6 Monate alten Sporocysten excystierten 40, 30 bzw. 10 %, während es bei den 12 Monate alten Sporocysten zu keiner Excystation mehr kam. In 4,5 %iger Kochsalzlösung schlüpften nur noch von den jüngsten Sporozoiten 10 %. Sie sahen morphologisch normal aus, waren jedoch in ihrer Bewegung ziemlich träge. Bei 5,0 % Kochsalz - Zusatz kam es bei Sporozoiten aller Altersstufen zu keiner Excystation.

In allen 4,5 und 5,0 %igen Medien enthielten viele Sporocysten geschrumpfte Sporozoiten.

Bei einer Wiederholung dieses Versuches nach 4 Wochen (Versuch 17) mit der jüngsten, jetzt 2 Monate alten Oocystenkultur stimmten die

Excystationsraten in den Medien mit 0,9 bis 3,0 % Kochsalz - Zusatz mit obigen Ergebnissen überein. In 3,5 %iger Kochsalzlösung excystierten jedoch 70 % und bei 4,0, 4,5 und 5,0 % Kochsalz - Zusatz 60, 50 bzw. 30 % der Sporozoiten aus.

Tabelle 6

Excystationsergebnisse verschieden alter Oocysten in unterschiedlich konzentrierten Kochsalzlösungen mit Zusatz von 0,2 % Trypsin und 8 % Galle bei 39° C.

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten nach 30 Minuten (siehe S. 27)

NaCl - Konzentration	1 Monat	3 Monate	6 Monate	12 Monate	alte Oocystenkultur
	PE	PE	PE	PE	
0,9 %	95	95	95	95	
1,5 %	95	95	95	95	
2,0 %	90	90	90	90	
2,5 %	80	80	80	80	
3,0 %	80	80	80	80	
3,5 %	50	50	40	20	
4,0 %	40	30	10	0	
4,5 %	10	0	0	0	
5,0 %	0	0	0	0	

B. Versuche mit Sporocysten

Versuch 8 Sporocysten wurden in Aqua dest. bei + 4° C aufbewahrt (Tabelle 7).

Bis zum 3. Tag excystierten jeweils 95 % der Sporozoiten. Im weiteren Verlauf des Versuches war bis zum 10. Tag ein allmählicher Abfall der Excystationsraten auf 70 % festzustellen. Diese Werte hielten sich bis zum Ablauf von 3 Wochen auf gleicher Höhe. Nach 24 und 28 Tagen excystierten jeweils 60 % der Sporozoiten.

Tabelle 7

Excystationsergebnisse nach unterschiedlich langer Aufbewahrungszeit der Sporocysten in Aqua dest. bei + 4⁰ C

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten nach 30 Minuten (siehe Seite 27)

Aufbewahrungszeit in Tagen	1	2	3	4	5	6	7	10	12	14	16	18	21	25	28
PE	95	95	95	90	85	80	80	70	70	70	70	70	70	60	60

Versuch 9 Sporocysten wurden in physiologischer Kochsalzlösung bei + 4⁰, 24⁰ und 39⁰ C aufbewahrt (Tabelle 8).

Aus den im Brutschrank bei 39⁰ C gehaltenen Sporocysten excystierten nach einem Tag 50 % der Sporozoiten; nach 2 und 3 Tagen waren es noch 20 bzw. 5 %. Am 4. Tag wurde keine Excystation mehr beobachtet.

Bei Aufbewahrung in Zimmertemperatur excystierten 4 Tage lang jeweils 95 % der Sporozoiten. Danach sanken die Werte etwa um jeweils 10 % pro Woche ab. Nach 6 und 7 Wochen excystierten noch 40 % der Sporozoiten.

Bei + 4⁰ C behielten die Sporozoiten bis zum 18. Tag ihre Fähigkeit zu excystieren. Von der 3. Woche an fielen die Werte bis zur 7. Woche allmählich von 90 auf 60 % ab.

Tabelle 8

Excystationsergebnisse nach unterschiedlich langer Aufbewahrungszeit von Sporocysten in physiologischer Kochsalzlösung bei 39⁰, 24⁰ und 4⁰ C

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten nach 30 Minuten (siehe S. 27)

Aufbewahrungszeit in Tagen	Aufbewahrungstemperatur		
	39 ⁰ C	24 ⁰ C	4 ⁰ C
	PE	PE	PE
1	50	95	95
2	20	95	95
3	5	95	95
4	0	95	95
5	-	80	95
6		80	95
7		80	95
10		80	95
14		70	95
16		70	95
18		70	95
21		65	90
25		60	85
28		60	80
35		50	80
42		40	70
49		40	60

Versuch 10 Sporocysten wurden in unterschiedlichen Kaliumbichromat-Konzentrationen bei + 4⁰ C aufbewahrt (Tabelle 9)

Eine 15 bis 30 Minuten lange Einwirkungsdauer von 0,05 bis 2,0 % Kaliumbichromat überstanden alle Sporocysten. Jeweils 95 % der Sporozoiten schlüpften aus. Bei 1,0 und 2,0 % Kaliumbichromat - Zusatz ergaben sich nach einer Stunde bereits niedrigere Excystationsraten

(70 bis 80 %), während aus den Sporocysten, die in 0,5; 0,1 und 0,05 %iger Lösung aufbewahrt wurden, noch jeweils 95 % der Sporozoiten excystierten.

Nach 3 bis 6 stündiger Einwirkungsdauer war bei allen Kaliumbichromat - Konzentrationen eine zunehmende bzw. beginnende Verschlechterung der Excystation zu beobachten. Nach 12 Stunden excystierten aus den in 2,0; 1,0 und 0,5 %iger Kaliumbichromatlösung aufbewahrten Sporocysten nur noch 15 bis 20 %, bei 0,1 % Kaliumbichromat - Zusatz 40 %, bei 0,05 % noch 80 % der Sporozoiten.

Tabelle 9

Excystationsergebnisse nach unterschiedlich langer Aufbewahrung von Sporocysten in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen Kaliumbichromat bei + 4° C

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten

BR = Bewegungsrate (siehe S. 27/28)

Einwirkungs- zeit	% Kaliumbichromat									
	2,0		1,0		0,5		0,1		0,05	
	PE	BR	PE	BR	PE	BR	PE	BR	PE	BR
15 Min.	95	5	95	5	95	5	95	5	95	5
30 Min.	95	5	95	5	95	5	95	5	95	5
1 h	70	5	80	5	95	5	95	5	95	5
3 h	60	4	75	4	85	5	85	5	95	5
6 h	35	2	35	2	40	3	65	4	85	5
12 h	15	1	15	2	20	2	40	4	80	5
1 Tg.	15	1	15	2	20	2	35	3	40	4
3 Tge.	15	1	15	2	20	2	30	3	40	4

Die Excystationswerte sanken danach im allgemeinen nur noch unwesentlich oder gar nicht mehr; nur bei 0,05 % Kaliumbichromat - Zusatz war zwischen der 12. und 24. Stunde noch ein weiterer Abfall von 80 auf 40 % zu verzeichnen.

Mit zunehmender Einwirkungsdauer von Kaliumbichromat auf die Sporocysten wurde auch die Motilität der excystierten Sporozoiten zunehmend geringer, besonders bei den höheren Kaliumbichromat - Konzentrationen.

Versuch 11 Sporocysten wurden in physiologischer Kochsalzlösung und in Aqua dest. bei Zimmertemperatur und bei 39° C eingetrocknet.

Unterschiede zwischen Eintrocknung der Sporocysten in physiologischer Kochsalzlösung und in Aqua dest. wurden nicht beobachtet. Bei Untersuchung der Proben auf dem Objektträger unterm Deckglas sowie am hängenden Tropfen waren jeweils die gleichen Vorgänge zu sehen.

Bei sämtlichen Proben hatte der Inhalt der Sporocysten nach Anfeuchten der Präparate mit ExcystationsmEDIUM eine blässere Farbe angenommen. Nur gelegentlich hoben sich unterschiedlich große Granula durch eine etwas dunklere Farbtönung von den oft kaum erkennbaren Sporozoiten ab.

In den bei Zimmertemperatur eingetrockneten Präparaten wurde beobachtet, wie nach 5 bis 10 Minuten langer Einwirkungsdauer des Excystationsmediums viele Sporozoiten zu excystieren begannen. Der meist als erstes außerhalb der Sporocyste sichtbare, unterschiedlich lange stabartige Fortsatz des Sporozoiten erschien jedoch nicht so kompakt wie in allen vorausgegangenen Versuchen, sondern nur undeutlich konturiert und sehr viel blasser, fast durchscheinend und "leer". Oft wurde beobachtet, wie sich dieser Fortsatz langsam ballonartig vergrößerte, bis er plötzlich platzte, wobei ein aus winzigen Granula bestehender, sonst nahezu farbloser Inhalt herausströmte, der sich allmählich im Medium auflöste. Danach glitt die leere Sporozoitenhülle vollends aus der Sporocyste heraus. Die Umrisse dieser lysierten Sporozoiten waren oft kaum erkennbar; einige enthielten noch den zusammengeschrumpften, blaß gefärbten Hyalinkörper. Vereinzelt "leere" Sporozoiten excystierten auch ohne daß Lysis zu beobachten war. Bei allen diesen Vorgängen wurden weder innerhalb der Sporocysten noch während oder nach der Excystation Bewegungen von Sporozoiten gesehen. Ganz vereinzelt wurden jedoch auch excystierende und freie, morphologisch normale

Sporozoiten gefunden, die sich träge bewegten.

In der bei 39° C eingetrockneten Probe setzten nach 5 bis 10 Minuten langer Einwirkungsdauer des Excystationsmediums ähnliche Vorgänge ein. Viele Sporozoiten begannen aus der Sporocystenmikropyle herauszugleiten, meist jedoch nicht vollständig. Oft blieb während der ganzen Beobachtungszeit nur jener stabartige Fortsatz sichtbar, oder die "leeren" Sporozoiten ragten etwa bis zur Hälfte aus den Sporocysten heraus und blieben dann stecken, ohne daß Lysis beobachtet werden konnte. Nach etwa 15 bis 20 Minuten waren viele leeren Sporocysten zu sehen, ohne daß außerhalb von ihnen eine entsprechende Anzahl von Sporozoiten zu finden gewesen wäre. In einigen dieser Sporocysten wurden zahlreiche Granula unterschiedlicher Größe bemerkt, die teilweise durch die Mikropyle nach außen strömten.

C. Lebensdauer von Sporozoiten unter verschiedenen chemischen bzw. physikalischen Einflüssen

1. Excystationsmedium und dessen Bestandteile

Versuch 12 Sporozoiten wurden im Excystationsmedium bei 39°, 24° und 4° C aufbewahrt (Tabelle 10)

Bei 39° C blieben die Sporozoiten bei unveränderter Dichte 4 Stunden lang morphologisch normal und gut beweglich. Nur 5 % waren bis dahin pathologisch verändert. Sie waren um etwa ein Viertel bis zur Hälfte der Körperlänge verkleinert. Die sonst normalerweise sichelförmige Gestalt war nunmehr birnenförmig oder rundlich oval (Abb. Ia; 2, 3). Nach 5 Stunden hatte die Dichte um ca. 25 % abgenommen. 90 % der verbliebenen Sporozoiten sahen normal aus; ihre Bewegungen waren etwas träger geworden.

Nach 6 Stunden war die Dichte bereits auf die Hälfte gesunken. Unter den Sporozoiten sahen 80 % morphologisch normal aus bzw. waren zum Teil etwas verkürzt und wiesen dabei ein sehr spitzes und schmales Vorderende auf (Abb. Ia; 1). Die restlichen 20 % waren mehr oder weniger stark pathologisch verändert. Einige waren kaum mehr als

Sporozoitcn zu erkennen und bis auf etwa ein Zehntel der Normalgröße zusammengeschrumpft (Abb. Ia; 7). Andere besaßen noch ca. ein Viertel der normalen Körperlänge, waren fast rund und hatten zum Teil an der Spitze oder an der Seite eine bläschenförmige Ausbuchtung (Abb. Ia; 4, 5, 6). Viele Sporozoitcn - morphologisch normal aussehende wie pathologisch veränderte - waren zu Klumpen von 3, 4, bis zu 10, 20 und mehr agglutiniert.

Nach 7 Stunden war der M - Wert auf 60 % abgefallen; auch die Bewegungsintensität hatte weiter nachgelassen. Nach 8 Stunden hatte die Dichte um etwa 75 % abgenommen. Nur noch 20 % der Sporozoitcn hatten normales Aussehen, bewegten sich jedoch nicht. Nach 9 Stunden wurden nur noch einige pathologische Formen beobachtet, und nach 10 Stunden waren sämtliche Sporozoitcn verschwunden.

Tabelle 10

Lebensdauer von Sporozoitcn im Excystationsmcdium bei 39°, 24° und 4° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, D = Dichte (siehe S. 27/28)

Aufbewahrungstemperatur:

39° C				24° C				4° C			
h	M	BR	D	h	M	BR	D	h	M	BR	D
1	100	5	4	5	100	5	4	12	100	5	4
2	100	5	4	10	100	5	4	24	95	5	4
3	95	4	4	15	90	4	4	36	90	5	4
4	95	4	4	20	80	4	4	48	75	4	4
5	90	3	3	25	55	1	4	60	45	2	4
6	80	3	2	30	5	0	3	72	20	0	4
7	60	2	2	35	0	-	2	84	0	-	3
8	20	0	1	40	-		1	96	-		2
9	0	-	1	45			1	108			1
10	-		0	50			1	120			1
				55			1	132			0
				60			1				
				65			1				
				70			0				

Die gleichen Vorgänge spielten sich wesentlich verlangsamt bei den beiden anderen Temperaturen ab.

Bei 24° C traten nach 15 Stunden die ersten pathologischen Formen auf. Während nach 20 Stunden noch 80 % normal aussehende Sporozoiten lebhaft Bewegung zeigten, war die Motilität 5 Stunden später schon fast erloschen. Zwischen der 25. und 30. Stunde kam es zu einem starken Abfall des M - Wertes von 55 auf 5 %. Die Dichte hatte bis dahin um ein Viertel, nach weiteren 5 Stunden um die Hälfte und nach 40 Stunden um ca. 75 % abgenommen. Nach 70 Stunden waren keine Sporozoiten mehr zu sehen.

Bei 4° C fiel der M - Wert bis zur 36. Stunde nur allmählich auf 90 % ab; nach 48 Stunden hatte bei nun noch 75 % morphologisch normal aussehenden Sporozoiten die Bewegungsintensität nur wenig nachgelassen. Nach 60 Stunden sahen noch 45 %, nach 72 Stunden nur 20 % der Sporozoiten morphologisch normal aus. Zu diesem Zeitpunkt war die Motilität erloschen.

Nach 84 Stunden waren nur noch pathologische Formen zu sehen, die Dichte war um ca. ein Viertel zurückgegangen und nahm auch im weiteren Verlauf stetig ab. Nach 132 Stunden (5,5 Tagen) waren keine Sporozoiten mehr sichtbar.

Bei 24° und 4° C war nach 20 bzw. 48 Stunden eine im weiteren Versuchsverlauf gleichbleibende Agglutination in etwa demselben Grad wie bei 39° C (A +) nach 6 Stunden zu beobachten.

Versuch 13 Sporozoiten wurden in unterschiedlich konzentrierten Trypsinlösungen bei 39° C inkubiert (Tabelle 11)

In 5,0 und 10,0 %iger Trypsinlösung waren sofort Veränderungen in der Morphologie und der Bewegung festzustellen. Unmittelbar nach dem Einbringen der Sporozoiten in 10 %ige Trypsinlösung hörte jegliche Bewegung auf. Die Körperform blieb erhalten, die Innenstruktur wurde aber bei sämtlichen Sporozoiten undeutlich. Eine Grenze zwischen Hyalinkörper und Vorderende war nicht mehr zu erkennen, das gesamte Protoplasma erhielt eine einheitliche Färbung. Nach etwa

10 Minuten waren bei vereinzeltten Sporozoiten wieder ganz schwache Beugebewegungen erkennbar. Innerhalb von 30 bis 60 Minuten wurde die Innenstruktur wieder deutlicher. Von 90 % morphologisch normal aussehenden bewegten sich noch einzelne Sporozoiten, nach 2 Stunden jedoch keine mehr. Nach 3 und 4 Stunden waren bereits 25 bzw. 45 % pathologisch verändert. Manche hatten noch ihre normale Körperform, ihre Ränder waren aber zum Teil gewellt oder zackig, zum Teil richtiggehend ausgefranst (Abb. Ia; 8, 13, 14). Einige Sporozoiten sahen in der Längsachse verdreht oder verzogen aus; andere waren bis auf die Hälfte der normalen Körperlänge zusammengeschrumpft, und bei vielen war das Vorderende sehr schmal geworden, während das Hinterende mit dem Hyalinkörper ballonartig aufgequollen war (Abb. Ia; 9). Die restlichen 55 % sahen noch weitgehend normal aus, Bewegung war jedoch nicht mehr festzustellen. Im weiteren Verlauf fielen die M - Werte schnell weiter ab; nach 12 Stunden waren alle Sporozoiten pathologisch verändert.

In 5 %iger Trypsinlösung nahm die Bewegungsintensität ebenfalls sofort ab, jedoch nicht so stark wie in der 10 %igen Lösung. Die Körperform der Sporozoiten blieb unverändert, bei einigen war die Innenstruktur ebenso undeutlich geworden wie in der 10 %igen Lösung. Nach 3 Stunden waren die ersten pathologischen Formen zu sehen. Die M - Werte fielen allmählich von 90 % bis zur 10. Stunde auf 50 % ab. Nach 18 Stunden waren keine morphologisch normal aussehenden Sporozoiten mehr zu beobachten.

Die Bewegungsintensität hatte nach 3 Stunden weiter abgenommen, und von der 5. bis zur 9. Stunde wurden nur noch von einzelnen Sporozoiten träge Beugebewegungen ausgeführt. Nach 10 Stunden waren keine Bewegungen mehr zu beobachten.

In den Medien mit 0,1 bis 4,0 % Trypsin - Zusatz blieben die Sporozoiten zunächst morphologisch unverändert und waren bis zur 1. Stunde gut beweglich. Nach 3 bis 4 Stunden traten die ersten pathologischen Formen auf. Die Abnahme der M - Werte verlief bei diesen Trypsinkonzentrationen bis zur 12. Stunde etwa gleich, danach bei 3,0 und 4,0 % Trypsin - Zusatz schneller. In diesen beiden Medien waren nach 17 Stunden, in den 1,0 und 2,0 %igen Trypsinlösungen nach 21 Stunden

und bei 0,1; 0,2 sowie 0,5 % Trypsin - Zusatz nach 22 bis 24 Stunden sämtliche Sporozoiten pathologisch verändert. Es wurden zum Teil die oben beschriebenen Formen in den verschiedensten Variationen gefunden, meist aber hatten die zugrunde gegangenen Sporozoiten das gleiche Aussehen wie in physiologischer Kochsalzlösung (z. B. Versuch 15).

Ähnlich wie die M - Werte nahm auch die Bewegungsintensität der Sporozoiten allmählich ab. Nach 9 Stunden in 4 %iger, nach 10 Stunden in 0,2 %iger sowie nach 11 bis 13 Stunden in den restlichen Medien hatten die Bewegungsraten den Nullpunkt erreicht.

Die Dichte war in der 10 %igen Trypsinlösung nach 12 Stunden um etwa ein Viertel, nach 24 Stunden um ca. die Hälfte zurückgegangen. In allen anderen Medien war die Dichte nach 12 Stunden noch unverändert und hatte nach 24 Stunden um etwa ein Viertel abgenommen.

Versuch 14 Sporozoiten wurden in unverdünnter Galle von Kaninchen, Schwein und Rind bei 39° C inkubiert (Tabelle 12)

Die Ergebnisse waren bei den drei verschiedenen Gallearten so ähnlich, daß sie - auch in der Tabelle - zusammengefaßt wurden.

Eine Stunde lang blieben die Sporozoiten morphologisch unverändert, danach traten die ersten pathologischen Formen auf, die ähnlich wie die in Versuch 12 beschriebenen aussahen. Von der 2. bis zur 3. Stunde fiel der M - Wert plötzlich von 90 auf 45 % ab, danach sank er nur noch allmählich. Nach 8 Stunden wurden die letzten morphologisch normal aussehenden Sporozoiten (5 %) beobachtet.

Die in den ersten beiden Stunden noch sehr gute Motilität hatte bis zur 3. Stunde ebenfalls stark nachgelassen. Von der 4. bis zur 6. Stunde wurden nur noch vereinzelt träge Beugebewegungen beobachtet, und nach 7 Stunden hatte die Bewegungsrate den Nullpunkt erreicht.

Die Dichte blieb bis zur 3. Stunde unverändert und nahm dann allmählich ab. Nach 4, 6 und 8 Stunden war jeweils ein Verlust von ca. 25 % zu verzeichnen, und nach 12 Stunden waren keine Sporozoiten mehr zu sehen.

Nach 3 Stunden war es bei einzelnen Sporozoiten zur Agglutination gekommen. Die Verklumpung nahm bis zur 5. Stunde weiter zu.

Tabelle 12

Lebensdauer von Sporozoiten in unverdünnter Galle bei 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, D = Dichte, A = Agglutination (siehe S. 27 - 29)

Zeit in Stunden	M	BR	D	A
1	100	5	4	-
2	90	5	4	-
3	45	2	4	+
4	30	1	3	+
5	30	1	3	++
6	25	1	2	++
7	10	0	2	++
8	5	0	1	++
9	0	-	1	++
10	-		1	++
11			1	++
12			0	

2. Verschiedene Kochsalz - Konzentrationen

Versuch 15 Sporozoiten wurden in 0 bis 3,0 %iger Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur gehalten (Tabelle 13, 14 u. 15)

Da nur in den Medien mit 0 bis 0,7 % sowie 1,6 bis 3,0 % Kochsalz - Zusatz innerhalb der ersten 5 Stunden bemerkenswerte Veränderungen auftraten, wurden die Ergebnisse bei diesen Konzentrationsbereichen bis zur 5. Stunde in gesonderten Tabellen aufgeführt (Tabelle 13: 0 bis 0,7 % NaCl und Tabelle 14: 1,6 bis 3,0 % NaCl). Die Tabelle 15 enthält die Ergebnisse von 0,3 bis 3,0 %igen Kochsalzlösungen von der 5. Stunde an.

In Aqua dest. und Leitungswasser reagierten die Sporozoiten in gleicher Weise. Bei der Beobachtung direkt nach dem Vermischen der Sporozoiten mit dem Wasser waren die Veränderungen bereits in vollem Gang. Sämtliche Sporozoiten wurden zusehends ballonartig größer (oder waren es bereits), nahmen rundlich - ovale und schließlich fast kugelförmige Formen an (Abb. Ia; 10, 15, 18), wobei das Plasma immer heller

Tabelle 13

Reaktion von Sporozoiten in Aqua dest. und 0,1 bis 0,7 %iger Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur bis zur 5. Stunde

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, L = Lysis (siehe S. 27/28)

Zeit	H ₂ O	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
direkt	60 5 L+	60 5 L+	80 5 L-	80 5 L-	80 5 L-	80 5 L-	90 5 L-	100 5 L-
10 Sek.	40 4	40 4	60 5	60 5	60 5	70 5	80 5	100 5
20 Sek.	10 0	20 1	30 2	60 5	60 5	60 5	80 5	80 5
30 Sek.	0 -	10 0	10 0	30 5	50 5	60 5	80 5	80 5
40 Sek.	L + +	0 -	5 -	30 5	40 5	60 5	80 5	70 5
50 Sek.			5	25 5	40 5	50 5	70 5	70 5
60 Sek.		L + +	0	30 5 L+	40 5	50 5	60 5	60 5
90 Sek.	L + + +			30 5	40 5	50 5	50 5	60 5
2 Min.				40 5	40 5	40 5	60 5	70 5
3 Min.				40 5 L-	50 5	50 5	70 5	90 5
5 Min.				45 5	60 5	60 5	70 5	90 5
10 Min.		L + + +	L + +	50 5	70 5	60 5	90 5	100 5
30 Min.				50 5	70 5	70 5	90 5	100 5
1 h			L + + +	50 5	80 5	80 5	100 5	100 5
2 h				60 5	80 5	90 5	100 5	100 5
3 h				60 4	85 5	90 5	100 5	100 5
4 h				65 4	85 4	90 5	100 5	100 5
5 h				70 4	90 4	90 4	95 0	100 5

wurde und eine Grenze zwischen Hyalinkörper und Vorderende bald nicht mehr zu erkennen war. Einzelne Sporozoiten erreichten dabei die Form und Größe von Sporocysten. Plötzlich sah man das granuliertes Plasma an einer Stelle herausströmen, oft einige Sporozoitenlängen weit, bis es sich allmählich im Medium auflöste. Zurück blieb eine leere Hülle, die meistens wieder die ursprüngliche Sporozoitenform annahm und an der manchmal eine oder zwei kleine runde Ausbuchtungen zu sehen waren. Nach 1,5 Minuten wurden außer leeren Hüllen keine morphologisch normal aussehenden und keine pathologisch veränderten Sporozoiten mehr gefunden.

In 0,1 und 0,2 %iger Kochsalzlösung reagierten die Sporozoiten nicht anders, nur etwas langsamer. Hier waren erst nach 10 Minuten bzw. nach einer Stunde die letzten Sporozoiten lysiert.

Auch in der 0,3 %igen Kochsalzlösung wurden sämtliche Sporozoiten zunächst sehr schnell plumper, größer und rundlich (Abb. Ia; 10, 18), bewegten sich dabei noch sehr lebhaft, und einige begannen etwa nach einer Minute zu lysieren. Dies war jedoch nur bei ca. 25 % der Fall. Nach etwa 3 Minuten wurde keine Lysis mehr beobachtet. Die Sporozoiten bewegten sich in ihrer abnormen Form weiterhin sehr lebhaft und wurden allmählich wieder etwas schlanker. Bald war die ursprüngliche Form mehr oder weniger deutlich erkennbar, und nach 30 Minuten sahen bereits 50 % der Sporozoiten wieder morphologisch normal aus. Nach 2 Stunden wurden nur noch wenige aufgedunsene und blasse Formen gesehen, die sich - wie die anderen, normal aussehenden Sporozoiten - gut bewegten. Die leeren Hüllen schrumpften mit der Zeit zusammen und waren schließlich nicht mehr wahrnehmbar. Die Sporozoitendichte hatte somit um ca. ein Drittel abgenommen.

Bei sämtlichen höheren Kochsalz - Konzentrationen wurden weder Lysis noch Dichteveränderungen beobachtet.

In 0,4 bis 0,7 %iger Kochsalzlösung veränderten die Sporozoiten zunächst mehr oder weniger ihre Gestalt in der oben beschriebenen Weise, wie aus den anfangs abfallenden und dann wieder ansteigenden M - Werten in Tabelle 13 hervorgeht.

In den Lösungen mit 0,8 bis 1,5 ‰ Kochsalz - Zusatz wurden innerhalb der ersten 5 Stunden keinerlei Veränderungen beobachtet.

In den 1,6 und höher prozentigen Kochsalzlösungen (Tabelle 14) traten gleich zu Beginn mehr oder weniger starke Reaktionen auf.

Direkt nach Zusatz von 1,6 ‰ Kochsalz wurden die Bewegungen der Sporozysten langsamer. Einige Sporozysten wurden etwas schmaler, und die Grenze zwischen Hyalinkörper und Vorderende wurde undeutlich oder war überhaupt nicht mehr zu erkennen, so daß das Plasma eine einheitliche Farbe erhielt. Die Bewegungsintensität nahm bereits nach einer Minute wieder zu - auch bei veränderten Sporozysten, deren Innenstruktur nach und nach wieder deutlicher zum Vorschein kam.

Ähnliche, aber deutlicher ausgeprägte Veränderungen traten bei den Kochsalz - Konzentrationen von 1,7; 1,8 und 1,9 ‰ auf. In 2,0 ‰iger Kochsalzlösung hörte jede Bewegung innerhalb einer halben Minute auf. Nur wenige Sporozysten sahen noch normal aus, die anderen wiesen die bereits geschilderten Strukturveränderungen auf. Bei einigen wurden ganz feine, wellige Unebenheiten der Ränder bemerkt. Nach ca. 4 Minuten konnte man aber beobachten, daß einzelne Sporozysten, auch solche, die morphologisch nicht normal aussahen, mit zunächst kaum wahrnehmbaren Beugebewegungen begannen. Im Laufe der nächsten Stunden wurden diese Bewegungen etwas lebhafter. Nach 5 Stunden sahen fast alle Sporozysten wieder normal aus.

Mit diesen Vorgängen stimmten die in den 2,1; 2,2 und 2,3 ‰igen Kochsalzlösungen im wesentlichen überein.

In den Medien mit 2,4 bis 3,0 ‰ Kochsalz - Zusatz hörte schlagartig jede Bewegung auf. Die Sporozysten "erstarrten" richtiggehend und blieben in der Stellung, in der sie sich gerade befunden hatten, regungslos liegen. (Abb. Ia; 16, 17). Bei allen wurden mehr oder weniger deutliche Veränderungen festgestellt. Neben den schon beschriebenen der Innenstruktur traten auch äußerliche Abweichungen von der Normalform auf. Viele Sporozysten hatten deutlich wellige, gezackte oder gekerbte Ränder, andere waren wesentlich schmaler geworden und an einem oder an beiden Enden scharf zugespitzt (Abb. Ia; 19). Nach einer Stunde

Zeit	% KOCHSALZ														
	1,6	1,7	1,8	1,9	2,0	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	3,0
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
direkt	100 3	90 2	90 2	60 2	50 1	30 1	30 1	20 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
30 Sek.	80 4	80 2	70 1	40 1	20 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
60 Sek.	80 5	70 2	50 1	30 1	10 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
90 Sek.	80 5	70 3	50 1	30 1	10 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
2 Min.	80 5	70 3	50 2	30 2	10 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
3 Min.	80 5	60 3	50 3	30 2	10 0	20 0	20 0	10 0	10 0	10 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
4 Min.	90 5	60 3	50 3	30 2	10 1	30 0	20 0	30 0	10 0	10 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
5 Min.	90 5	70 3	60 3	40 2	20 1	30 0	40 0	30 0	10 0	10 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
10 Min.	95 5	70 3	60 3	40 2	20 1	30 1	40 0	30 0	10 0	20 0	10 0	10 0	10 0	0 0	0 0
30 Min.	95 5	80 4	60 3	50 2	40 1	30 1	40 1	30 1	20 0	20 0	20 0	10 0	20 0	0 0	0 0
1 h	95 4	80 4	70 3	50 3	40 1	30 1	40 1	40 2	30 1	20 1	20 0	20 0	20 0	10 0	10 0
2 h	100 4	80 4	80 3	60 3	50 1	50 1	40 1	50 2	60 1	30 1	20 0	30 0	20 0	20 0	20 0
3 h	100 4	80 4	90 4	80 3	60 2	50 2	60 1	60 2	70 1	50 1	40 1	30 1	20 0	30 0	20 0
4 h	100 4	95 4	90 4	80 3	70 2	80 2	70 2	80 2	70 2	60 1	70 1	50 1	50 0	40 0	25 0
5 h	100 4	100 4	100 4	95 3	95 2	95 2	95 2	95 2	85 2	80 2	80 2	70 2	70 1	50 0	25 0

Tabelle 14

Reaktion von Sporozoiten in 1,6 bis 3,0 %iger Kochsalzlösung bei

Zimmertemperatur bis zur 5. Stunde

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S. 27/28)

waren bei vielen Sporozoiten die Ränder wieder eben und glatt geworden, und nach 3 bis 5 Stunden waren in den 2,4 bis 2,8 %igen Lösungen die M - Werte auf 70 bis 85 %, bei 2,9 und 3,0 % Kochsalz - Zusatz auf 40 bis 50 % angestiegen. In den beiden zuletzt genannten Medien waren bis zu diesem Zeitpunkt keine Bewegungen festgestellt worden, während in 2,4 bis 2,8 %iger Kochsalzlösung einzelne Sporozoiten nach 1 bis 5 Stunden wieder träge Beuge- und vereinzelt auch Gleitbewegungen zeigten.

Im weiteren Verlauf des Versuches (Tabelle 15) konnte in allen Medien, deren Kochsalz - Konzentration geringer als 2,9 % war, eine allmähliche Abnahme der M - Werte beobachtet werden. In den 2,9 und 3,0 %igen Kochsalzlösungen kam es noch bis zur 20. Stunde zu einem geringgradigen Anstieg und danach ebenfalls zu einem Abfall dieser Werte.

Nach 60 Stunden waren bei 0,3 % Kochsalz - Zusatz sämtliche Sporozoiten pathologisch verändert. Zu dieser Zeit wurden in den 0,4; 0,5 sowie 2,4 bis 3,0 %igen Lösungen noch 30 bis 40 %, in den 0,6 bis 2,3 %igen Lösungen 50 bis 75 % morphologisch normale Sporozoiten beobachtet. Nach 100 bis 115 Stunden enthielten die Medien mit 0,4; 0,5; 0,6 sowie 2,9 und 3,0 % Kochsalz - Zusatz nur noch pathologische Formen, während bei Kochsalz - Konzentrationen zwischen 0,7 und 2,7 % noch M - Werte von durchschnittlich 20 bis 40 % festgestellt wurden.

Alle pathologisch veränderten Sporozoiten waren um etwa die Hälfte oder ein Viertel kürzer geworden und erhielten dadurch ein birnenförmiges bis rundliches Aussehen (Abb. Ia; 2, 3, 4). Bei vielen wurden ein oder zwei bläschenartige Ausbuchtungen an der Seite oder am Vorderende beobachtet (Abb. Ia; 5, 6).

Parallel zu der Abnahme der M - Werte wurden auch die Bewegungen der Sporozoiten allmählich träger. Lediglich in der 2,4 %igen Kochsalzlösung konnte in der 10. Stunde eine vorübergehende Zunahme der Bewegungsintensität beobachtet werden. Bei 2,9 % Kochsalz - Zusatz wurden einmal nach 15 Stunden ganz vereinzelt träge Beugebewegungen festgestellt, während in diesem Medium - ebenso wie in 3,0 %iger Lösung - bei allen vorausgegangenen und nachfolgenden

Tabelle 15

Lebensdauer von Sporozoiten in 0,3 bis 3,0 %iger Kochsalzlösung
bei Zimmertemperatur

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

h	% KOCHSALZ																
	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6			
Zeit	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
5	70 4	90 4	90 4	95 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4
10	60 4	80 4	80 4	85 4	90 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	95 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4
15	50 4	75 3	75 4	85 4	90 4	95 5	100 5	100 5	100 5	100 4	95 4	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3
20	40 3	70 3	75 4	80 4	85 4	90 4	90 4	95 4	90 4	95 4	95 4	95 3	95 3	95 3	95 3	90 3	90 3
25	30 2	70 3	75 3	80 4	80 4	85 4	85 4	90 4	90 4	95 3	95 3	90 3	95 3	95 2	85 2	85 2	85 2
30	30 2	70 2	75 3	75 4	80 3	85 3	80 4	85 3	90 3	95 3	90 3	85 3	85 2	85 2	85 2	85 2	85 2
35	25 1	60 2	60 3	75 3	75 3	80 3	80 3	80 3	85 2	90 2	80 2	80 2	85 1	85 1	85 1	85 1	85 1
40	20 0	45 1	55 3	70 3	70 3	75 3	80 3	80 3	85 2	85 2	70 2	80 2	80 1	80 1	80 1	80 1	80 1
45	10 -	40 1	45 2	70 2	65 3	75 3	75 3	80 3	80 2	85 2	65 1	80 1	80 1	80 1	80 1	80 1	80 1
50	10	35 0	40 2	70 2	60 2	75 3	70 2	70 3	75 2	80 2	65 1	80 1	80 1	80 1	80 1	75 1	75 1
55	5	35 -	40 1	60 2	60 2	70 2	65 2	70 2	70 2	80 2	60 1	70 1	80 1	80 1	75 -	75 -	75 -
60	0	30	35 0	50 1	55 1	60 1	65 1	65 1	70 1	75 1	60 1	60 1	75 0	70	70	70	70
65	-	25	30	40 0	50 0	50 0	60 0	60 0	60 1	65 1	55 0	60 1	70 -	70	70	70	70
70	-	25	30	40 -	50 0	50 0	60 -	60 -	60 1	65 1	55 0	60 1	70 -	70	70	70	70
75	-	25	25	35	45 -	50 -	55 -	55 -	55 0	60 1	50	55 -	60	60	60	60	60
80	-	20	20	30	40	45	50	50	55 -	60 1	50	50	55	55	55	55	55
85	-	10	10	25	35	45	50	45	50	55 0	45	50	55	50	50	50	50
90	-	5	10	20	30	45	45	45	50	50 -	45	45	50	40	40	40	40
95	-	5	10	10	30	40	40	45	45	45	35	40	45	40	40	40	40
100	-	0	5	10	25	35	35	40	40	35	30	30	35	30	30	30	30
105	-	-	5	5	20	30	35	35	30	30	25	25	35	30	30	30	30
110	-	-	0	0	20	25	30	30	20	25	20	20	35	30	25	20	20
115	-	-	-	-	15	25	25	25	20	25	20	20	30	25	20	20	20
120	-	-	-	-	10	25	20	25	20	20	10	25	20	15	15	15	15
125	-	-	-	-	5	20	15	20	10	15	10	20	20	15	15	15	15
130	-	-	-	-	5	10	10	15	5	10	10	15	15	15	15	15	15

Tabelle 15

(. Fortsetzung)

h	% KOCHSALZ																
	Zeit	1,7	1,8	1,9	2,0	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	3,0		
		M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
5		100	4	100	4	95	3	95	2	85	2	80	2	80	2	70	1
10		100	4	100	4	95	2	95	2	75	3	75	2	60	1	70	1
15		95	3	95	3	90	2	90	1	70	2	60	2	60	1	60	0
20		95	3	90	2	80	1	80	1	65	0	60	1	65	0	45	50
25		90	2	85	2	80	1	80	1	55	-	50	1	55	-	45	60
30		90	2	85	2	80	1	75	0	50	0	45	50	40	50	40	40
35		85	1	80	1	80	0	75	-	50	0	40	40	40	50	40	40
40		80	1	80	1	70	-	70	65	50	45	45	40	40	45	40	40
45		80	0	80	1	65	65	65	45	40	40	40	40	40	45	40	40
50		75	-	80	0	65	60	60	45	40	40	40	40	40	45	35	35
55		70	70	60	55	50	60	50	40	40	40	40	40	35	30	30	30
60		60	60	55	55	50	50	50	40	35	35	35	35	35	30	30	30
65		55	55	55	50	45	45	40	35	30	35	35	35	35	25	30	30
70		50	55	50	45	45	40	40	35	30	35	30	35	35	25	25	25
75		45	55	45	40	40	40	40	30	30	35	30	35	35	25	20	20
80		45	50	45	40	40	40	40	25	20	25	30	35	35	25	20	20
85		40	45	45	40	40	40	40	25	20	25	30	30	25	20	15	15
90		40	45	45	35	40	35	40	25	20	25	25	25	20	20	10	10
95		40	40	45	35	35	35	35	25	20	25	25	25	20	15	10	10
100		30	40	40	35	35	35	35	20	20	20	25	25	20	15	10	10
105		30	40	30	35	35	35	35	20	20	20	20	20	20	10	5	5
110		25	30	30	30	35	35	35	20	15	15	20	20	10	0	0	0
115		20	25	20	25	30	25	30	20	10	15	20	15	10	0	-	-
120		15	25	15	15	20	15	25	20	10	15	15	10	10	5	5	5
125		10	15	15	15	20	10	25	15	10	15	15	15	15	10	10	10
130		5	10	15	15	20	5	20	15	10	10	10	10	10	0	0	0

Untersuchungen keinerlei Motilität beobachtet werden konnte.

Nach 15 bis 30 Stunden kam es in den 2,2 bis 2,8 %igen, nach 35 bis 55 Stunden in den 1,6 bis 2,0 %igen Kochsalzlösungen zum endgültigen Bewegungsstillstand. In den Medien mit Kochsalz - Zusätzen zwischen 0,5 und 1,5 % blieb die Motilität am längsten erhalten. Hier hörten die Bewegungen erst nach 60 bis 75, in 1,2 %iger Lösung erst nach 85 Stunden auf. Bei 0,3 und 0,4 % Kochsalz - Zusatz hatte dagegen die Bewegungsrate bereits nach 40 bzw. 50 Stunden den Nullpunkt erreicht.

Nach längerer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur (ca. 30 bis 40 Stunden) waren die Sporozoiten in den verschiedenen Medien bei den Probenuntersuchungen oft zunächst regungslos und fingen erst nach einiger Zeit (bis zu 15 Minuten und länger) auf dem Wärmetisch bei 39⁰ C an sich zu bewegen. Durch eine Einstellung des Wärmereglers auf 50⁰ bis 60⁰ C konnte diese Zeit meistens verkürzt und die Bewegungsintensität oft erhöht werden.

In einem Kontrollversuch wurden Sporozoiten, die 5 Minuten, eine bzw. 5 Stunden lang in 2,8; 2,9 und 3,0 %iger Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur gehalten wurden, abzentrifugiert und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Direkt danach bewegten sich sämtliche Sporozoiten wieder lebhaft und sahen morphologisch normal aus. Nach 15 Stunden langer Einwirkungszeit wirkte die physiologische Kochsalzlösung nur bei wenigen Sporozoiten als "Weckmittel". Sehr viele der noch normal aussehenden wurden augenblicklich kürzer, rundlich bis birnenförmig und sahen somit aus wie die oben beschriebenen pathologischen Formen. Andere blieben oder wurden morphologisch normal aussehend, bewegten sich jedoch nicht.

Der gleiche Effekt konnte erzielt werden, wenn die in den jeweiligen Medien aufbewahrten Sporozoiten nach den gleichen Einwirkungszeiten nicht abzentrifugiert und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, sondern auf dem Objektträger im Verhältnis 1 : 1 mit physiologischer Kochsalzlösung vermischt wurden.

Versuch 16 Sporozoiten wurden in 0,3 bis 3,0 %iger Kochsalzlösung bei 39° C inkubiert (Tabelle 16)

Die Ergebnisse innerhalb der ersten Stunde entsprachen bis auf geringe Abweichungen denen von Versuch 15. Auch im weiteren Verlauf waren die Resultate weitgehend vergleichbar, es zeigte sich lediglich ein wesentlich schnellerer Ablauf der Ereignisse.

In fast allen Medien fielen die M - und BR - Werte allmählich ab. In 2,7 %iger Kochsalzlösung hörten die vereinzelt beobachteten trägen Beugebewegungen nach der 3. Stunde auf, wurden dann aber in der 7. Stunde erneut gesehen. Ebenso wurden in 2,8 %iger Lösung in der 6. und 7. Stunde einzelne träge Bewegungen registriert, nachdem bis zu diesem Zeitpunkt keine Motilität festzustellen gewesen war. Bei 2,9 und 3,0 % Kochsalz - Zusatz konnten im gesamten Versuchsablauf keine Bewegungen beobachtet werden. Jedoch stiegen hier, wie in Versuch 15, die M - Werte zunächst auf 40 % an und fielen danach nur sehr langsam wieder ab.

In 0,3 und 0,4 %iger Kochsalzlösung waren nach 14 bzw. 17 Stunden nur noch pathologische Formen enthalten. In 0,5; 0,6; 0,7 sowie 2,9 und 3,0 %iger Lösung hatten die M - Werte nach 21 bis 23 Stunden den Nullpunkt erreicht, bei 0,8; 0,9 und 1,0 % Kochsalz - Zusatz erst nach 24 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren in allen anderen Medien noch 5 bis 30 % morphologisch normal aussehende Sporozoiten zu sehen.

Die pathologischen Veränderungen entsprachen den in Versuch 15 beschriebenen.

In 0,3 bis 1,5 %iger Kochsalzlösung hörten die Bewegungen nach 9 bis 12 Stunden auf, in den höherprozentigen Medien schon nach 5 bis 8 Stunden.

Wie in Versuch 15 kam es auch hier in der 0,3 %igen Kochsalzlösung auf Grund von Lysis zu einer Dichteabnahme von ca. 25 %.

Nach Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung waren in den Medien mit 2,8 bis 3,0 % Kochsalz - Zusatz nach einer Stunde Einwirkungsdauer wieder ca. 60 % morphologisch normal aussehende und

Tabelle 16

Lebensdauer von Sporozoiten in 0,3 bis 3,0 %iger Kochsalzlösung bei 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S. 27)

Zeit h	% KOCHSALZ																	
	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6				
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
1	70 5	75 5	85 4	95 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4
2	60 4	70 4	80 4	85 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4
3	50 4	65 4	80 3	80 4	95 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 3	100 3	100 3	100 3	100 3	100 3	100 3
4	50 3	50 3	65 3	70 3	85 3	90 3	95 3	95 3	95 3	100 4	100 3	100 3	100 3	100 3	100 3	100 3	100 3	100 3
5	45 2	50 2	60 2	60 3	75 3	80 3	85 3	90 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3
6	40 2	40 2	50 2	50 2	70 2	80 2	85 2	85 2	90 2	95 3	95 3	90 2	90 1	90 1	90 1	90 1	90 1	90 1
7	20 2	30 3	40 2	50 2	70 2	80 2	80 2	85 2	80 2	85 2	90 1	85 1	85 1	85 1	85 1	85 1	85 1	85 1
8	15 1	30 1	40 1	50 2	60 2	80 2	75 2	85 2	80 1	85 1	90 1	90 1	90 1	90 1	90 1	90 1	90 1	90 1
9	10 0	20 0	35 1	40 1	60 1	75 1	70 1	75 1	75 1	75 1	90 1	80 0	80 0	80 0	80 0	80 0	80 0	80 0
10	10 -	20 -	30 1	30 0	50 1	65 1	65 1	70 1	75 0	75 1	75 1	80 -	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -
11	5	15	30 0	30	45 1	60 0	60 0	65 0	75 -	75 0	75 0	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -
12	5	10	20 -	25	45 0	55 -	60 -	65 -	70 -	75 -	70 -	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -	75 -
13	5	10	15	25	35 -	45 -	55 -	50	60	65	70	70	70	70	70	70	70	70
14	0	5	15	20	35	40	50	50	60	65	65	60	60	60	60	60	60	60
15	-	5	10	20	30	35	40	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
16	-	5	10	15	25	30	35	40	45	50	50	50	50	50	50	50	50	50
17	0	0	10	15	20	25	25	35	35	50	45	40	40	40	40	40	40	40
18	-	5	5	10	20	20	25	20	25	40	40	40	40	40	40	40	40	40
19	-	5	5	10	15	20	20	20	15	30	35	35	35	35	35	35	35	35
20	-	5	5	5	10	15	15	20	15	30	35	30	35	35	35	35	35	35
21	0	0	0	5	10	10	10	15	15	30	35	30	35	35	35	35	35	35
22	-	-	-	0	0	5	5	5	10	25	35	25	25	25	25	25	25	25
23	-	-	-	-	-	5	5	5	5	20	35	15	15	15	15	15	15	15
24	-	-	-	-	-	0	0	0	5	15	30	15	15	15	15	15	15	15

Tabelle 16

(Fortsetzung)

Zeit h	% KOCHSALZ														2,9	3,0
	1,7	1,8	1,9	2,0	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8				
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
1	100 3	100 3	100 3	100 2	100 2	100 2	90 2	90 1	80 1	80 1	80 1	30 0	20 0	20 0	10 0	
2	100 3	95 3	100 3	100 3	100 3	95 2	85 2	80 1	80 1	80 1	80 2	80 1	50 0	30 -	20 -	
3	95 2	95 2	100 2	95 2	95 2	95 2	75 2	80 1	80 1	80 1	80 1	75 1	70 0	40	25	
4	95 1	90 1	90 1	95 1	90 1	95 1	75 1	70 1	75 1	75 1	70 0	70 0	70 0	40	35	
5	95 1	90 1	90 1	95 1	90 0	90 1	75 1	70 1	75 1	70 1	70 0	70 0	70 0	30	40	
6	90 0	90 1	90 0	90 0	90 -	90 0	70 0	70 0	70 1	70 0	70 0	70 1	30	35		
7	90 -	90 0	90 -	90 -	85 -	85 -	70 -	70 -	65 0	70 -	70 1	75 1	30	25		
8	90 90	90 -	80 80	80 80	85 85	85 85	70 70	60 60	60 -	60 60	70 0	70 0	30	30		
9	80 75	70 70	70 70	70 60	70 70	70 70	65 65	45 45	50 50	50 50	60 -	70 -	30	30		
10	75 70	70 70	70 60	70 60	70 70	70 70	65 65	45 45	40 40	50 50	50 50	65 65	20	25		
11	75 70	70 70	70 60	70 60	70 70	70 70	65 65	45 45	40 40	45 40	40 40	65 65	20	25		
12	75 70	70 70	70 60	70 60	70 70	70 70	65 65	40 40	40 40	40 40	40 40	50 50	20	25		
13	65 65	65 60	60 55	60 55	60 60	60 60	60 60	35 35	35 35	40 40	40 40	50 50	20	25		
14	60 65	65 60	60 55	60 55	50 50	60 60	60 60	35 35	35 35	40 40	35 35	50 50	20	25		
15	60 60	60 55	60 55	50 50	45 45	60 60	50 50	35 35	35 35	35 35	35 35	50 50	20	25		
16	55 50	50 55	50 50	50 50	40 40	45 40	40 30	30 30	35 35	30 30	35 35	45 45	20	25		
17	55 50	50 50	50 50	50 50	40 40	40 40	30 30	30 30	35 35	30 30	35 35	45 45	20	25		
18	50 50	50 45	45 40	50 40	40 40	40 40	30 30	30 30	35 35	30 30	30 30	45 45	15	20		
19	40 50	50 40	40 40	35 40	35 40	35 35	30 30	30 30	30 30	20 20	30 30	40 40	15	10		
20	30 50	50 35	35 30	30 30	35 35	35 35	30 30	30 30	30 30	20 20	30 30	40 40	15	5		
21	30 40	40 30	30 30	30 30	35 35	35 35	25 25	30 30	30 30	20 20	30 30	40 40	10	0		
22	30 35	35 20	30 30	30 30	35 35	30 30	25 25	30 30	30 20	10 10	20 20	15 15	0	0		
23	20 30	30 10	25 10	25 25	35 35	30 30	25 25	30 20	30 20	10 10	20 20	15 15	0	-		
24	20 20	20 10	20 10	20 20	30 30	30 30	20 20	25 25	20 20	10 10	20 20	15 15	-	-		

gut bewegliche Sporozoiten zu sehen. Bei einer Wiederholung dieses Versuches nach 5 Stunden wurden bei allen drei Konzentrationen nur ca. 30 % normal aussehende, dafür aber bewegliche Sporozoiten beobachtet. Die restlichen hatten an Länge verloren und waren zu kleinen rundlichen oder ovalen bis birnenförmigen Gebilden geworden.

Versuch 17 In unterschiedlichen Kochsalz - Konzentrationen excystierte Sporozoiten wurden in den gleichen Kochsalzlösungen mit und ohne Trypsin und Galle - Zusatz weiter bei 39° C inkubiert (Tabelle 17).

Die Excystationsrate nahm mit steigender Kochsalz - Konzentration ab (siehe Versuch 17 und Tabelle 6 und 17).

In allen Excystationsmedien blieben sämtliche excystierten Sporozoiten 2 Stunden lang morphologisch unverändert und gut beweglich. Nach 2 Stunden war eine Abnahme in der Bewegungsintensität zu verzeichnen, die besonders stark in 5 %iger Kochsalzlösung war. Die von der 3. bis 4. Stunde an auftretenden pathologischen Formen sahen bei allen Kochsalz - Konzentrationen zum Teil aus wie die in Versuch 12 (im Excystationsmedium), zum Teil wie die in Versuch 15 und 16 (in den höher konzentrierten Kochsalzlösungen) beobachteten.

Nach 4 Stunden wurden in den Excystationsmedien mit 4,5 und 5,0 % Kochsalz - Zusatz keine Bewegungen mehr gesehen, in 3,5 und 4,0 %iger Lösung nach 5 Stunden, während sich zur gleichen Zeit in 2,0 und 2,5 %iger Kochsalzlösung noch einzelne Sporozoiten träge bewegten. Nach 6 Stunden war auch hier keine Motilität mehr zu beobachten.

Die M - Werte waren in den Excystationsmedien mit 2,0 bis 4,0 % Kochsalz - Zusatz nach 6 Stunden auf 70 bis 80 %, bei 4,5 und 5,0 % Kochsalz - Zusatz auf 40 bis 50 % abgefallen.

Direkt nach dem Auswaschen des Trypsins und der Galle war eine deutliche Abnahme der Bewegungsintensität zu beobachten. In 2,0 bis 3,0 %iger Kochsalzlösung bewegten sich die Sporozoiten noch einigermaßen gut, bei 3,5 % Kochsalz - Zusatz nur noch vereinzelt und sehr träge, bei 4,0 bis 5,0 % Kochsalz - Zusatz überhaupt nicht mehr. Die

% KOCHSALZ

Zeit nach Excy- sta- tion	2,0		2,5		3,0		3,5		4,0		4,5		5,0	
	PE: 95%		1	2	80 %		70 %		60 %		50 %		30 %	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
30 Min.	100 5 100 3	100 5 100 3	100 5 100 2	100 5 100 2	100 5 100 1	100 4 100 0	100 4 100 0	100 4 100 0	100 4 100 0	100 4 100 0	100 4 100 0	100 4 100 0	100 4 100 0	100 4 100 0
1 h	100 5 100 3	100 5 100 3	100 5 100 2	100 5 100 2	100 5 95 1	100 4 90 0	100 4 90 0	100 4 90 0	100 4 90 0	100 4 90 0	100 4 90 0	100 4 90 0	100 4 90 0	100 4 90 0
2 h	100 4 100 3	100 4 100 2	100 4 100 2	100 4 90 2	100 3 90 1	100 3 70 0	100 3 70 0	100 3 70 0	100 3 70 0	100 3 70 0	100 3 70 0	100 2 60 0	100 2 60 0	100 2 60 0
3 h	100 3 100 2	100 3 90 2	95 3 80 2	95 3 80 2	90 2 70 1	90 2 70 0	90 2 70 0	90 2 70 0	90 2 70 0	90 1 70 0	90 1 70 0	90 1 40 0	90 1 40 0	90 1 40 0
4 h	95 2 95 1	90 2 80 0	90 1 60 0	90 1 60 0	90 1 50 0	90 1 60 0	80 0 50 0	80 0 50 0	80 0 50 0	80 0 50 0	80 0 50 0	80 0 20 0	80 0 20 0	80 0 20 0
5 h	90 1 90 1	80 1 80 0	80 0 50 0	80 0 50 0	80 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0	70 0 50 0
6 h	80 0 90 0	80 0 70 0	80 0 30 0	80 0 30 0	70 0 30 0	70 0 20 0	70 0 20 0	70 0 20 0	70 0 20 0	70 0 20 0	70 0 20 0	70 0 20 0	70 0 20 0	70 0 20 0

Tabelle 17

Lebensdauer von Sporozoiten nach Excystation in 2,0 bis 5,0 %iger Kochsalzlösung bei 39° C mit und ohne Auswaschen von Trypsin und Galle 30 Minuten nach Versuchsbeginn

PE = Prozentsatz der excystierten Sporozoiten nach 30 Minuten

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S. 27/28)

Probe 1: Sporozoiten verblieben in der Excystationslösung

Probe 2: Trypsin und Galle wurden mit Kochsalzlösung des gleichen Prozentgehalts ausgewaschen. Versuchsbeginn für diese Probe war 30 Minuten nach Excystationsbeginn

Bewegungsintensität hielt sich in 2,0 bis 3,5 %iger Lösung bis zur 3. Stunde fast auf der gleichen Stufe wie direkt nach dem Auswaschen. Nach 4 Stunden waren nur noch bei 2,0 % Kochsalz - Zusatz einzelne träge Bewegungen zu beobachten, die noch bis zur 5. Stunde anhielten.

Die Abnahme der M - Werte verlief in 2,0 und 2,5 %iger Kochsalz - Lösung etwa gleich wie die in den Excystationsmidien mit derselben Kochsalz - Konzentration. Bei 3,0 bis 5,0 % Kochsalz - Zusatz war jedoch ein stärkerer und schnellerer Abfall zu verzeichnen, als in den entsprechenden Lösungen mit Trypsin und Galle.

Die Dichte blieb in allen reinen Kochsalzlösungen im ganzen Verlauf des Versuches unverändert, während sie in den entsprechenden Excystationsmidien nach 6 Stunden um etwa ein Drittel zurückgegangen war.

Versuch 18 Sporoziten wurden in unterschiedlich konzentrierten Kochsalzlösungen mit und ohne Trypsin - Galle - Zusatz bei 39° C inkubiert (Tabelle 18).

Unmittelbar nach Kontakt mit den jeweiligen Kochsalzlösungen kam es zum augenblicklichen Bewegungsstillstand. Nur bei 2,0 % Kochsalz - Zusatz wurde bei einzelnen Sporoziten noch langsames Beugen beobachtet. In dieser Lösung sahen noch etwa 50 % der Sporoziten normal aus, während bei allen anderen Kochsalz - Konzentrationen sämtliche Sporoziten pathologisch verändert waren (siehe Versuch 15 und 16). Bis zum Ablauf einer Stunde war der M - Wert in 2,0 %iger Lösung wieder auf 100, in 2,5 %iger Lösung auf 80 angestiegen. Nach 3 bis 4 Stunden fielen diese Werte allmählich ab bis auf 90 bzw. 70 % nach der 6. Stunde. Bei 3,0 % Kochsalz - Zusatz waren nach einer Stunde wieder ca. 10 % morphologisch normal aussehende Sporoziten vorhanden. Der M - Wert nahm dann allmählich weiter bis auf 40 % nach 5 und 6 Stunden zu. In den 3,5 bis 5,0 %igen Lösungen waren im ganzen Verlauf des Versuches nur pathologische Formen zu beobachten.

Bei 2,0 % Kochsalz - Zusatz nahm die Bewegungsintensität bis zur 2. Stunde zu und danach langsam wieder ab. Nach 6 Stunden waren keine Bewegungen mehr festzustellen, ebenso wie in der 2,5 %igen

% KOCHSALZ

Zeit	2,0		2,5		3,0		3,5		4,0		4,5		5,0	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
0	50 1	- -	0 0	- -	0 0	- -	0 0	- -	0 0	- -	0 0	- -	0 0	- -
30 Min.	80 1	- -	40 0	- -	0 0	- -	0 0	- -	0 0	- -	0 0	- -	0 0	- -
1 h	100 2	100 3	80 2	80 3	10 0	30 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
2 h	100 3	100 4	80 1	100 3	20 0	50 3	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
3 h	95 2	100 3	80 1	100 3	20 0	50 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
4 h	95 1	95 2	75 1	90 1	35 0	50 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
5 h	95 1	80 0	75 1	70 0	40 0	40 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
6 h	90 0	70 0	70 0	60 0	40 0	40 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

Tabelle 18

Lebensdauer von Sporozoiten in 2,0 bis 5,0 %iger Kochsalzlösung mit und ohne

Trypsin - Galle - Zusatz bei 39° C, nach Excystation in physiologischer

Kochsalzlösung

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

Probe 1: Sporozoiten in reiner Kochsalzlösung

Probe 2: 1 Stunde nach Versuchsbeginn Zusatz von 0,2 % Trypsin und 8 % Galle

Lösung, in der erstmals nach einer Stunde bei vielen, in der 2. bis 5. Stunde nur noch bei einzelnen Sporozoiten träge Bewegungen beobachtet werden konnten. In 3,0 bis 5,0 %iger Kochsalzlösung wurden im gesamten Versuchsablauf keine Bewegungen registriert.

Durch Zusatz von Trypsin und Galle nach einer Stunde wurden die Sporozoiten in 2,0 und 2,5 %iger Kochsalzlösung sofort etwas beweglicher, und auch bei 3,0 % Kochsalz - Zusatz war eine Stunde später (also nach insgesamt 2 Stunden) wieder recht gute Motilität zu beobachten. Auch die Anzahl der morphologisch normal aussehenden Sporozoiten hatte zugenommen.

Die Bewegungsintensität hielt in 2,0 und 2,5 %iger Kochsalzlösung bis zur 3. Stunde an, wurde danach jedoch schnell wieder geringer und war nach 5 Stunden zum Erliegen gekommen. Ebenfalls von der 3. Stunde an fielen die M - Werte merklich schneller ab als in den gleichen Kochsalzlösungen ohne Trypsin und Galle. In dem Medium mit 3,0 % Kochsalz - Zusatz waren schon nach 4 Stunden keine Bewegungen mehr feststellbar.

In den 3,5 bis 5,0 %igen Kochsalzlösungen waren durch den Zusatz von Trypsin und Galle keinerlei Veränderungen eingetreten.

Die Dichte war in allen Medien mit Trypsin und Galle nach 6 Stunden um etwa ein Drittel zurückgegangen, während in den anderen Lösungen keine Abnahme zu verzeichnen war.

3. Kaliumbichromat

Versuch 19 Sporozoiten wurden in physiologischer Kochsalzlösung mit unterschiedlichen Kaliumbichromat - Konzentrationen bei 39° C inkubiert (Tabelle 19).

In 2,0; 1,5 und 1,0 %iger Kaliumbichromatlösung kam es zum augenblicklichen Bewegungsstillstand. Die Sporozoiten blieben in der Stellung, in der sie sich gerade befanden, regungslos liegen (Abb. Ia; 16, 17). Bei Konzentrationen von 0,5 bis 0,01 % erstarben die Bewegungen ebenfalls, jedoch nicht so abrupt, sondern innerhalb von 30 Sekunden

Tabelle 19

Lebensdauer von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung
mit unterschiedlichen Kaliumbichromat - Konzentrationen bei 39° C
M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

Zeit	% KALIUMBICHROMAT															
	2,0	1,5	1,0	0,5	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,003	0,001	0,0008	0			
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
direkt	90 0	100 0	100 0	100 1	100 1	100 1	100 1	100 2	100 3	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
30 Sek.	90 0	100 0	100 0	100 0	100 1	100 1	100 1	100 1	100 2	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
60 Sek.	90 -	100 -	100 -	100 0	100 1	100 1	100 1	100 1	100 1	100 4	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
90 Sek.	90 100	100 100	100 -	100 1	100 1	100 1	100 1	100 1	100 1	100 3	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
2 Min.	90 100	100 100	100 100	100 0	100 1	100 1	100 1	100 1	100 1	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
3 Min.	90 100	100 100	100 100	100 100	100 -	100 0	100 0	100 1	100 1	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
4 Min.	90 100	100 100	100 100	100 100	100 100	100 -	100 -	100 2	100 3	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
5 Min.	90 100	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
10 Min.	90 100	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
30 Min.	85 90	85 90	90 100	90 100	90 100	90 100	90 100	100 4	100 4	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
1 h	60 70	70 80	80 80	80 80	80 80	80 80	80 80	85 2	95 3	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4
2 h	50 60	60 60	60 60	65 70	70 80	70 80	70 80	85 2	95 3	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4
3 h	25 40	40 50	50 50	55 60	60 70	60 70	60 70	60 0	80 2	90 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3	95 3
4 h	15 25	25 35	35 40	40 45	45 50	45 50	45 50	50 -	70 2	85 2	85 3	85 3	85 3	85 3	85 3	85 3
5 h	10 10	10 20	20 25	25 30	30 35	30 35	30 35	30 35	30 35	40 40	40 40	40 40	40 40	40 40	40 40	40 40
6 h	0 5	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
7 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
8 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
9 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
10 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
11 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
12 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
13 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
14 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80
15 h	-	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55	55 60	60 65	65 70	70 75	75 80

bis 3 Minuten. Auch in 0,005 %iger Lösung wurde die Motilität der Sporozoiten zunächst immer geringer, bis nur noch vereinzelt träges Beugebewegungen zu beobachten war. Nach ca. 4 Minuten jedoch wurden diese Beugebewegungen wieder lebhafter und von immer mehr Sporozoiten ausgeführt. In den nächsten Minuten wurden die Sporozoiten stetig reger und waren nach einer halben Stunde alle wieder sehr beweglich. Im weiteren Verlauf ließ die Motilität allmählich wieder nach und hörte nach 5 Stunden endgültig auf.

In 0,003 und 0,001 %iger Lösung nahm die Intensität der Bewegungen nur geringgradig ab und dann schnell wieder zu, während in 0,0008%iger Lösung keine Veränderungen beobachtet wurden. Nach 3 Stunden führten in diesen drei Medien sämtliche Sporozoiten noch lebhaft Bewegungen aus, deren Intensität danach allmählich nachließ. In 0,003 %iger Kaliumbichromatlösung waren nach 8 Stunden, in 0,001 und 0,0008 %iger Lösung nach 11 bzw. 12 Stunden keine Bewegungen mehr zu sehen.

Nach Kontakt mit 2,0 %iger Kaliumbichromatlösung veränderten sich Form und Gestalt der Sporozoiten zunächst nicht. Nur bei einem Fall war die Innenstruktur so undeutlich geworden, wie es in Versuch 15 (in hypertonen Kochsalzlösungen) geschildert wurde. In allen anderen, niedrigeren Konzentrationen wurden keinerlei derartige Veränderungen beobachtet. Die Zeitdauer des Abfalls der M - Werte verhielt sich zur Höhe der Kaliumbichromat - Konzentration umgekehrt proportional.

Die pathologisch veränderten Sporozoiten in den 2,0 bis 0,005 %igen Lösungen waren um ein Viertel oder um die Hälfte kürzer geworden und hatten birnenförmige, ovale oder rundliche Gestalt angenommen. Während der meist scharf umrissene Hyalinkörper eine einheitlich klare, dunklere Farbe aufwies, erhielt das heller gewordene Plasma des Vorderendes eine indifferente Granulierung. Es war oft nur undeutlich und wellig umrandet und schien im Ganzen zusammengeschrumpft zu sein, so daß zwischen ihm und dem Hyalinkörper eine helle rundliche Zone entstand (Abb. Ib; 32, 33, 34, 35).

Neben diesen Formen traten in 0,003 und 0,001 %iger Lösung bei

einigen, in 0,0008 %iger Lösung bei den meisten Sporozoiten die Veränderungen auf, wie sie in reiner physiologischer Kochsalzlösung (Versuch 15) beschrieben wurden.

In 0,003 bis 2,0 %iger Kaliumbichromatlösung wurde in zunehmendem Grade (A + bis A + +) Agglutination beobachtet, meist schon nach ca. 10 Minuten. Auch in 0,001 %iger Lösung klebten ganz vereinzelt kleinere Gruppen von Sporozoiten aneinander; diese Verklumpung löste sich jedoch zum Teil durch die Eigenbewegung der Sporozoiten wieder auf.

Die nach einer Stunde aus den 0,01 bis 0,1 %igen Kaliumbichromatlösungen ausgewaschenen Sporozoiten fingen zum größten Teil wieder an, sich mehr oder weniger intensiv zu bewegen, während dies nach Auswaschen der höherprozentigen Lösungen nicht beobachtet wurde.

Versuch 20 Sporozoiten wurden in Aqua dest. mit unterschiedlichen Kaliumbichromat - Konzentrationen bei 39° C inkubiert.

In sämtlichen Medien kam es zum augenblicklichen Bewegungsstillstand. In 4,0 %iger Lösung wurden zunächst keine Form- und Strukturveränderungen bemerkt. Erst von der 3. Minute an erhielten immer mehr Sporozoiten gleiches Aussehen wie die in Versuch 19 beschriebenen. In 2,0 %iger Lösung wurden innerhalb einer Minute alle Sporozoiten dicker, runder und blasser (Abb. Ia; 10, 15). Nach etwa 5 Minuten fielen einige von ihnen ruckartig in sich zusammen und wurden dabei um die Hälfte oder mehr kleiner. Das Plasma von Hyalinkörper und Vorderende erschien undeutlich schmutziggrau granuliert und wie geronnen. Nach 30 Minuten waren alle Sporozoiten in dieser Weise verändert (Abb. Ib; 36).

Die gleichen Vorgänge, jedoch wesentlich schneller, spielten sich in den 1,0; 0,5 und 0,1 %igen Lösungen ab. In der letzteren waren schon nach 30 Sekunden alle Sporozoiten derartig verändert.

Genau so schnell waren in 0,05 %iger Lösung die Sporozoiten zunächst aufgedunsen und dann zusammengeschrumpft. Bei etwa 30 % kam es vor oder nach diesem Vorgang plötzlich zu einem blitzschnellen

Ausschießen eines langen schmalen Plasmafadens; dieser war nicht flüssig und verlor sich nicht wie in reinem Aqua dest. (Versuch 15) in der Lösung, sondern blieb als starres Anhängsel an den kleinen, runden Sporozoitenresten haften (Abb. Ib; 37, 38, 39).

In 0,025 und 0,01 %iger Kaliumbichromatlösung wurden die Sporozoiten ebenfalls zunächst rundlich und ballonartig größer. Sie schrumpften dann aber schnell wieder zusammen, wurden dabei immer blasser und erreichten schließlich meist ihre Normalform wieder. Man konnte jedoch sehen, daß es nur leere Sporozoitenhüllen waren, es war zur Lysis gekommen ohne sichtbares Ausfließen des Plasmas.

Erst in 0,005 %iger Kaliumbichromatlösung wurde Lysis in gleicher Weise wie in reinem Aqua dest. festgestellt.

Bei Probenuntersuchungen nach einer Stunde waren in allen Lösungen keine weiteren, bemerkenswerten Veränderungen eingetreten.

4. Verschiedene pH Werte

Versuch 21 Sporozoiten wurden in PBS und physiologischer Kochsalzlösung mit unterschiedlichen pH Werten bei 39° C inkubiert (Tabelle 20).

Die Ergebnisse in physiologischer Kochsalzlösung und PBS stimmten weitgehend überein und wurden daher - auch in der Tabelle - zusammengefaßt.

Bei pH 2 hörten alle Sporozoiten sofort auf sich zu bewegen und erhielten innerhalb von wenigen Sekunden ein rundliches bis längliches, aufgedunsenes Aussehen, wie es auch in Versuch 15 in hypotonischen Kochsalzlösungen vor dem Platzen zu beobachten war (Abb. Ia; 10, 15). Allerdings fand hier keine Lysis statt. Auch bei späteren Untersuchungen wurden keine morphologisch normal aussehenden und beweglichen Sporozoiten gefunden.

Ähnliche Vorgänge waren bei pH 3 zu beobachten. Es kam zum sofortigen Bewegungsstillstand. Nur ca. 40 % der Sporozoiten sahen völlig oder annähernd normal aus, der Rest veränderte sich in der Weise,

wie es oben geschildert wurde. Nach etwa 5 Minuten begannen einzelne Sporozoiten sich kaum merklich zu beugen und zu strecken. Diese Bewegungen wurden allmählich lebhafter und von immer mehr Sporozoiten ausgeführt. Nach 30 Minuten ließ die Bewegungsintensität jedoch wieder nach, und nach einer Stunde war bei jetzt 20 % normal aussehenden Sporozoiten keine Bewegung mehr festzustellen. Innerhalb von 6 Stunden fiel der M - Wert auf den Nullpunkt ab. Lysis trat auch in diesem Medium nicht auf.

Bei pH 4 wurden nach wenigen Minuten ebenfalls etwa 30 % der Sporozoiten plump, rundlich und bewegungslos. Nach 30 und 60 Minuten sahen aber wieder 90 % normal aus und bewegten sich gut. Nach 5 Stunden wurden die letzten vereinzelt Bewegungen registriert. Der M - Wert war zu diesem Zeitpunkt auf 35 % abgefallen und erreichte nach 10 Stunden den Nullpunkt.

Im Bereich von pH 5 bis 9 wurden innerhalb der ersten Stunde keinerlei Veränderungen festgestellt. Danach kam es zu einer allmählichen Abnahme der Bewegungsintensität. Bei pH 9 waren nach 7 Stunden, bei pH 5 bis pH 8 erst nach 9 bis 11 Stunden sämtliche Sporozoiten bewegungslos. Die M- Werte fielen entsprechend bei pH 9 bis zur 15. Stunde, bei pH 5 bis pH 8 nach 20 bis 24 Stunden auf Null ab. Die pathologischen Veränderungen glichen denen in Versuch 15 (in physiologischer Kochsalzlösung).

Bei pH 10 blieben die Sporozoiten zunächst morphologisch unverändert und gut beweglich. Nach einer Stunde traten pathologische Formen auf, die weitgehend in ihrem Aussehen denen bei pH 3 und 4 beschriebenen ähnelten. Von einzelnen Sporozoiten waren jedoch nur die leeren Hüllen sichtbar, ohne daß vorher der Vorgang der Lysis hätte beobachtet werden können. Die Motilität ließ bis zur 3. Stunde stark nach. Nach 4 Stunden war bei den noch 35 % normal aussehenden Sporozoiten keine Bewegung mehr festzustellen. Nach 8 Stunden waren ca. zwei Drittel lysiert, der Rest pathologisch verändert.

Bei pH 11 kam es innerhalb von 5 Minuten zum Bewegungsstillstand. Schon nach wenigen Sekunden waren von etwa 10 % der Sporozoiten

Tabelle 20

Lebensdauer von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung
bzw. PBS bei unterschiedlichen pH Werten und 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, L = Lysis (siehe S.27/28)

Zeit	pH 2	3	4	5	5,7	6	7	8	9	10	11	12
	M BR M BR M BR M BR M BR M BR M BR M BR M BR M BR											
direkt	60 0	80 0	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	90 4	50 0
1 Min.	0 -	40 0	90 3	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	80 2	0 -
5 Min.	-	40 1	70 3	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	60 0	L++
10 Min.	L -	40 4	70 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	50 -	
30 Min.		40 2	90 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	40 -	
1 h		20 0	90 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	80 4	15
2 h		15 -	70 3	90 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	100 4	70 3	10
3 h		10	60 2	90 4	100 4	100 4	100 4	95 4	85 3	45 1	5	
4 h		5	50 2	80 3	95 3	100 3	95 3	90 3	70 2	35 0	0	
5 h		5	35 1	75 2	90 3	90 3	90 3	85 2	60 1	20 -		
6 h		0	25 0	70 1	85 2	90 2	90 2	85 2	45 1	10	L++	
7 h		-	15 -	65 1	80 2	85 2	80 2	80 1	35 0	5		
8 h		L -	10	60 1	75 2	80 2	80 1	70 1	30 -	0		
9 h			5	50 0	70 1	85 1	70 1	60 0	25 -			
10 h			0	45 -	65 1	70 1	70 1	55 -	20	L++		
11 h				40	60 0	65 0	65 0	50	20			
12 h			L -	35	60 -	60 -	55 -	40	10			
13 h				30	55	60	50	35	5			
14 h				20	50	55	50	30	5			
15 h				20	40	45	50	20	0			
16 h				15	35	35	40	10	-			
17 h				10	25	25	30	10	L -			
18 h				10	25	20	20	5				
19 h				5	20	10	20	5				
20 h				0	15	10	15	5				
21 h				-	10	10	10	0				
22 h					5	5	5	-				
23 h					5	0	5	L -				
24 h					0	-	0					
					L -	L -	L -					

nur leere Hüllen zu sehen. Die Lysis trat so plötzlich auf, daß sie nur ganz vereinzelt beobachtet werden konnte: aus völlig normal aussehenden Sporozoiten schoß unvermittelt das Plasma heraus, ohne daß vorher eine Formveränderung festzustellen war. Die Austrittsstelle war bei allen beobachteten Fällen stets die Spitze des Vorderendes. Nach 5 Minuten war der M - Wert auf ca. 60 % abgefallen. Etwa 20 % waren lysiert, der Rest mehr oder weniger stark aufgedunsen, ähnlich wie in saurem Milieu. Ein Platzen dieser ballonartigen Formen konnte auch hier nicht festgestellt werden. Dennoch erschienen im Laufe der weiteren Untersuchungen immer mehr leere Sporozoitenhüllen. Nach 4 Stunden waren sämtliche Sporozoiten lysiert.

Bei pH 12 kam es bei allen Sporozoiten fast augenblicklich zur Lysis, die derart explosionsartig erfolgte, daß nach etwa einer Minute nur noch leere Sporozoitenhüllen sichtbar waren.

Versuch 22 Sporozoiten wurden in physiologischer Kochsalzlösung und zwei Ringerlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung bei pH 8,0 und 39⁰ C inkubiert (Tabelle 21).

Die M - Werte fielen in physiologischer Kochsalzlösung und in Ringerlösung II bis zur 11. Stunde nahezu gleichmäßig auf 50 % ab. Zu diesem Zeitpunkt waren in der Ringerlösung I nur noch 10 % normal aussehende Sporozoiten enthalten, nach 13 Stunden überhaupt keine mehr. Nach 17 Stunden waren in Ringerlösung II und nach 21 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung nur noch pathologische Formen zu sehen. Diese glichen den in Versuch 15 in physiologischer Kochsalzlösung beobachteten.

Auch die Bewegungen nahmen an Intensität in der Ringerlösung I am schnellsten ab; sie waren hier nach 7 Stunden, in Ringerlösung II nach 8 Stunden und in physiologischer Kochsalzlösung erst in der 9. Stunde erloschen.

Tabelle 21

Lebensdauer von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung
und zwei Ringerlösungen (Zusammensetzung siehe S. 39)
bei pH 8 und 39⁰ C.

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

h	physiol. Koch- salzlösung		Ringerlösung I		Ringerlösung II	
	M	BR	M	BR	M	BR
1	100	5	100	5	100	5
2	100	4	100	4	100	4
3	95	4	90	3	95	3
4	90	3	85	3	90	3
5	85	3	80	2	85	2
6	85	2	80	1	85	2
7	80	1	70	0	75	1
8	70	1	60	-	70	0
9	60	0	40		70	-
10	55	-	25		60	
11	50		10		50	
12	40		5		35	
13	35		0		25	
14	30		-		20	
15	20				10	
16	10				5	
17	10				0	
18	5				-	
19	5					
20	5					
21	0					

5. Verschiedene Temperaturen

Versuch 23 Sporozoiten wurden in physiologischer Kochsalzlösung bei + 4⁰, 24⁰ und 39⁰ C aufbewahrt (Tabelle 22).

Am längsten war die Haltbarkeit im Kühlschrank bei + 4⁰ C. Noch nach 4 Tagen bewegten sich fast alle Sporozoiten lebhaft. Danach fiel der M - Wert allmählich auf 50 % am 10. und schließlich auf Null am 15. Tag ab. Auch die Bewegungsintensität ließ nur langsam nach. Nach 11 und 12 Tagen waren die letzten trägen Bewegungen sichtbar.

Bei Zimmertemperatur (siehe auch Versuch 15) waren nach 20 Stunden die ersten pathologischen Veränderungen zu bemerken. Nach 35 Stunden hatte bei einem M - Wert von 80 % die Beweglichkeit merklich nachgelassen und kam nach 70 Stunden zum Stillstand. Zu dieser Zeit sahen noch 60 % der Sporozoiten normal aus. Der M - Wert fiel dann allmählich weiter auf 20 % nach 120 Stunden (= 5 Tage) ab und erreichte nach 150 Stunden den Nullpunkt.

Die Ergebnisse bei 39⁰ C stimmten mit denen der Versuche 16 und 21 überein.

Die pathologischen Veränderungen entsprachen bei + 4⁰, 24⁰ und 39⁰ C denen des Versuches 15 u. a.

Tabelle 22

Lebensdauer von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung
bei + 4⁰, 24⁰ und 39⁰ C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

Tage	4 ⁰ C		h	24 ⁰ C		h	39 ⁰ C	
	M	BR		M	BR		M	BR
1	100	5	5	100	5	1	100	5
2	100	5	10	100	5	2	100	4
3	95	4	15	100	5	3	100	4
4	95	4	20	90	4	4	95	3
5	80	4	25	85	4	5	90	3
6	80	4	30	80	4	6	85	2
7	75	3	35	80	3	7	80	2
8	60	3	40	80	3	8	75	2
9	55	2	45	75	3	9	70	1
10	50	2	50	70	2	10	65	1
11	40	1	55	65	2	11	60	0
12	25	1	60	65	1	12	60	-
13	10	0	65	65	1	13	55	
14	5	-	70	60	0	14	50	
15	0		75	55	-	15	40	
16	-		80	55		16	35	
			85	50		17	25	
			90	45		18	25	
			95	40		19	20	
			100	35		20	15	
			105	35		21	10	
			110	30		22	5	
			115	25		23	5	
			120	20		24	0	
			125	15				
			130	10				
			135	10				
			140	5				
			145	5				
			150	0				

Versuch 24 Sporozoiten wurden in physiologischer Kochsalzlösung bei 50⁰, 60⁰ und 70⁰ C gehalten (Tabelle 23).

Wurden die Sporozoiten bei Zimmertemperatur in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und jeweils ein Tropfen auf dem Objektträger nach Auflage eines Deckgläschens auf dem vorgewärmten Heiztisch beobachtet, so war zu sehen, daß sich die Sporozoiten mit zunehmender Wärme immer schneller und häufiger, vor allem gleitend bewegten. Nach etwa 5 bis 10 Minuten - bei den höheren Temperaturen eher als bei den niedrigeren - blieben einige plötzlich wie erstarrt liegen, wobei sich im gleichen Moment ihr Aussehen veränderte. Manche quollen etwas auf, wurden immer blasser, bis sie schließlich fast farblos waren. Bei diesen lysisähnlichen Erscheinungen war kein Austreten von Plasma sichtbar. Bei anderen war der Hyalinkörper zu einem kleinen rundlichen Gebilde zusammengefallen und in die Mitte gerückt. Wieder andere waren zum Teil etwas kürzer geworden, wobei das Vorderende etwas aufgetrieben aussah und seine Ränder uneben erschienen (Abb. Ia; 13, 14).

Bei Untersuchung der im Brutschrank gehaltenen Sporozoiten traten in denselben Temperaturbereichen nach 5 Minuten ebenfalls die ersten morphologischen Veränderungen in der eben beschriebenen Weise auf. Lysisähnliche Formen waren jedoch nicht zu sehen. Im weiteren Verlauf kamen noch andere pathologische Formen hinzu. Einige Sporozoiten hatten keulenartige oder kegelförmige Gestalt (Abb. Ia; 11), bei anderen war das Hinterende mit dem meist nicht mehr erkennbaren Hyalinkörper zu einem unförmigen Gebilde verzerrt, aus dem das schmalere gewordene Vorderende oft wie ein fingerartiger Fortsatz herausragte (Abb. Ia; 12).

Der M - Wert war bei 50⁰ C nach 40 Minuten auf 50 %, bei 60⁰ C auf 10 % abgefallen; bei 70⁰ C hatte er zu diesem Zeitpunkt bereits den Nullpunkt erreicht. Nach 50 Minuten waren auch bei 60⁰ C und nach 90 Minuten bei 50⁰ C keine morphologisch normalen Sporozoiten mehr zu sehen. Neben den geschilderten Veränderungen waren auch solche wie z. B. in Versuch 15 in physiologischer Kochsalzlösung eingetreten.

Tabelle 23

Lebensdauer von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung bei 50°, 60° und 70° C.

Probe 1: Sporozoiten wurden bei Zimmertemperatur in physiol. Kochsalzlg. suspendiert und dann inkubiert.

Probe 2: Sporozoiten wurden gleich in physiol. Kochsalzlg. der angegebenen Temperatur suspendiert.

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

	50° C		60° C		70° C	
Zeit	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
direkt	100 5	80 3	100 5	60 1	100 5	40 0
5 Min.	90 5	60 3	90 5	50 0	70 5	0 -
10 Min.	80 5	60 2	70 5	10 -	50 5	-
15 Min.	65 5	50 1	40 4	5	20 1	
20 Min.	60 4	40 1	30 3	0	5 0	
30 Min.	60 4	30 0	10 1	-	5 -	
40 Min.	50 4	10 -	10 0		0	
50 Min.	25 2	0	0 -		-	
60 Min.	10 0	-	-			
70 Min.	10 -					
80 Min.	5					
90 Min.	0					

Die Motilität kam bei allen drei Temperaturstufen - nach anfänglich verhältnismäßig lange anhaltender guter Intensität - sehr schnell zum Erliegen. Dies geschah bei 50° C nach einer Stunde, bei 60° und 70° C nach 40 bzw. 15 Minuten.

Suspendierte man die Sporozoiten in bereits auf 50°, 60° bzw. 70° C vorgewärmter Lösung und hielt sie weiter im Brutschrank bei diesen Temperaturen, so waren bei Direktbeobachtung bei 50° C bereits ca. 20 % pathologisch verändert, wobei auch die Beweglichkeit stark nachgelassen hatte. Der M - Wert fiel schnell weiter ab und erreichte nach

50 Minuten den Nullpunkt. Nach 20 Minuten waren die letzten ²trägen Bewegungen sichtbar.

Wesentlich schneller gingen die Sporozoiten bei den zwei anderen Temperaturen zugrunde. Die Motilität hörte innerhalb weniger Sekunden auf. Bei 60° C waren nach 20 Minuten, bei 70° C nach 5 Minuten nur noch pathologische Formen der oben beschriebenen Art zu beobachten.

6. Zentrifugation

Versuch 25 Sporozoiten wurden bei 2.000 bis 200.000 g zentrifugiert (Tabelle 24 und 25).

Die Sporozoiten waren nach Beendigung der Zentrifugation stets sehr beweglich. Bei 2.000, 5.000 und 10.000 g waren jeweils ca. 5 %, bei 30.000 g ca. 15 % pathologisch verändert. Bei 50.000 bis 200.000 g betrug der Verlust 20 bis 25 %. Zwischen 30 Minuten und 2 Stunden dauerndem Zentrifugieren war bei keiner der einwirkenden relativen Zentrifugalbeschleunigungen ein wesentlicher Unterschied festzustellen (Tabelle 24).

Tabelle 24

Resistenz von Sporozoiten gegen unterschiedliche relative Zentrifugalbeschleunigungen bei verschiedenen Einwirkungszeiten in physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur
M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

Zeitdauer der Zentri- fugation	relative Zentrifugalbeschleunigung (g)							
	2.000	5.000	10.000	30.000	50.000	100.000	150.000	200.000
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
30 Min.	95 5	95 5	95 5	85 5	80 5	80 5	75 5	75 5
60 Min.	95 5	95 5	95 5	85 5				
90 Min.	95 5	95 5	95 5	80 5				
120 Min.	95 5	90 5	90 5	80 5				

Die meisten der überlebenden (= beweglichen) Sporozoiten sahen morphologisch normal aus oder waren allenfalls etwas kürzer und spitzer geworden (Abb. Ia; 1). Bei einigen fiel auf, daß der Hyalinkörper sich weiter nach dem Vorderende zu verschoben hatte und fast in der Mitte lag (Abb. Ib; 26, 27). Unter den unbeweglichen Sporozoiten wurden die verschiedensten Formen gefunden. So sah man hantelförmige, rautenförmige und vielkantige Gebilde (Abb. Ib; 21, 22, 24, 25). Andere waren um ihre Längs- oder Querachse verdreht, abgeknickt oder regelrecht abgebrochen. Diese stark veränderten Formen waren jedoch nur Einzelfälle. Die meisten unbeweglichen Sporozoiten ähnelten denen in physiologischer Kochsalzlösung, z.B. in Versuch 15.

Als weitere Einzelfälle seien noch drei ziemlich stark deformierte Sporozoiten erwähnt (Abb. Ib; 20, 23, 28). Ohne Veränderung ihrer abnormen Form waren sie noch in der Lage, sich sehr lebhaft gleitend vorwärts oder im Kreis zu bewegen.

24 Stunden nach Ende der 30 Minuten dauernden Zentrifugation wurden in allen Medien noch mindestens 50 $\%$, maximal 80 $\%$ morphologisch normal aussehende Sporozoiten gesehen (Tabelle 25). Nach 84 Stunden lag der M - Wert bei 200.000 g mit 5 $\%$ am niedrigsten, während er bei 2.000 bis 10.000 g nur gering von dem der Kontrollprobe abwich.

Auch die Intensität der Bewegungen ließ bei den am stärksten zentrifugierten Sporozoiten von der 36. Stunde an am meisten nach. Bei 2.000 g wurden nach 60 Stunden die letzten trägen Bewegungen beobachtet, während zum gleichen Zeitpunkt in allen anderen Proben keine Motilität mehr festzustellen war.

Tabelle 25

Lebensdauer von Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur nach 30 Minuten langer Zentrifugation bei verschiedenen relativen Zentrifugalbeschleunigungen (g)

M =Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

relative Zentri- fugalbe- schleu- nigung (g)	0	12	24	36	48	60	72	84	Differenz der M - Werte zwischen der 0. und 84. Stunde
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	
2.000	95 5	95 5	80 4	70 3	60 2	50 1	50 0	45 0	50
5.000	95 5	90 5	75 4	70 3	65 2	60 0	50 0	50 0	45
10.000	95 5	80 5	65 4	60 3	60 2	50 0	45 0	40 0	55
30.000	85 5	75 5	60 4	50 3	45 2	40 0	30 0	30 0	55
50.000	80 5	70 5	55 4	45 3	40 1	30 0	20 0	20 0	60
100.000	80 5	70 4	50 4	40 3	40 1	30 0	30 0	25 0	55
150.000	75 5	65 4	50 4	40 1	25 1	20 0	10 0	10 0	65
200.000	75 5	70 4	60 4	45 1	35 1	25 0	15 0	5 0	70
3 mal 3 Min. bei 1.500 g	100 5	100 5	85 4	80 3	70 2	65 1	60 0	50 0	50

7. Eintrocknung

Versuch 26 Sporozoiten wurden bei Zimmertemperatur eingetrocknet.

Bei mikroskopischer Betrachtung waren in der eingetrockneten Suspension nur noch einzelne Sporozoiten erkennbar. Sie waren etwas kürzer und dicker, zum Teil aber auch etwas schmaler geworden. Der Hyalinkörper hatte stets einen ebenen, dunklen Rand, während das Vorderende meist zusammengeschrumpft, abgeknickt oder eingekerbt war (Abb. Ib; 40). Bei manchen Sporozoiten war in der meist welligen Umrandung des Vorderendes an dessen Spitze eine Öffnung, durch die das Plasma ausgetreten war.

Nach Anfeuchten mit physiologischer Kochsalzlösung waren wieder alle Sporoziten sichtbar. Die meisten hatten zwar ihre normale Körperform wieder angenommen, waren aber wesentlich blasser, ihr Vorderende sogar meist farblos. Bewegung war bei keiner dieser lysisähnlichen Formen zu beobachten.

8. Serum und Medien, die Serum enthalten

Versuch 27 Sporoziten wurden in unterschiedlichen Kaninchenserum bei 39° C inkubiert (Tabelle 26).

In sämtlichen Seren kam es zu folgenden morphologischen Veränderungen: manche Sporoziten wurden etwas kürzer und dicker; sie erhielten dadurch ein plumpes Aussehen, wobei das Vorderende noch mehr oder weniger deutlich zugespitzt war (Abb. Ib; 29). Da sich diese Sporoziten bewegten und morphologisch deutlich von den pathologischen, unbeweglichen Formen unterschieden werden konnten, wurden sie im weiteren Verlauf zusammen mit den normal aussehenden Sporoziten in den M - Werten erfaßt.

Die pathologisch stärker veränderten und unbeweglichen Sporoziten waren etwa um die Hälfte kürzer geworden und hatten stumpfe Pole. Bei vielen schien der Hyalinkörper innerhalb des Hinterendes zusammengeschrunpft zu sein (Abb. Ib; 30, 31). Im weiteren Verlauf wurden bei immer mehr dieser pathologischen Formen an der Spitze des Vorderendes oder an der Seite eine oder zwei bläschenartige Ausbuchtungen beobachtet (Abb. Ia; 5, 6).

Während in inaktiviertem Normalserum (1) und in Serum, das von einem Kaninchen 12 Tage nach einer Infektion mit E. stiedai entnommen worden war (3), alle Sporoziten bis zur 4. Minute morphologisch unverändert blieben, fiel der M - Wert in allen übrigen Seren schon früher ab, am schnellsten (nach ca. 10 Sekunden) in nicht inaktiviertem Immunserum (5). Auffallend war im Serum (3) (12 Tage p.i.) sowie in inaktiviertem Immunserum (6) eine relativ lange Zeitspanne mit mehr oder weniger normal aussehenden Sporoziten, worauf ein umso beschleunigter Abfall der M - Werte auftrat. Nach 20 Minuten waren

Tabelle 26

Lebensdauer von Sporozoiten in Serum verschiedener Kaninchen bei 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, L = Lysis,

A = Agglutination (siehe S.27/28)

Zeit	(1) Normal- serum	(2) Normal- serum inakt.	(3) Serum 12 Tage p. i.	(4) Serum v. Kan. m. Darm- Kokzid.	(5) Immun- serum	(6) Immun- serum inakt.	(7) Immun- serum 1:3 verd.
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
direkt.	100 5	100 5	100 5	100 5	100 4	100 5	100 5
10 Sek.	100 5	100 5	100 5	100 5	100 3	100 5	100 5
30 Sek.	100 5	100 5	100 5	100 5	95 3	100 5	100 5
60 Sek.	100 5	100 5	100 5	100 5	80 3	100 5	100 5
90 Sek.	100 4	100 5	100 5	100 5	75 3	100 5	100 5
2 Min.	95 4	100 5	100 5	100 5	65 2	100 5	100 5
3 Min.	90 4	100 4	100 5	90 5	30 1	80 4	95 5
4 Min.	85 4	100 4	100 5	80 4	20 1	30 2	95 4
5 Min.	80 4	90 4	85 4	50 4	15 0	20 1	90 4
10 Min.	60 4	60 4	20 0	20 2	5 -	00 -	90 3
15 Min.	50 4	40 4	0 -	10 0	0	-	85 3
20 Min.	45 4	35 4	-	0 -	-		75 3
30 Min.	30 3	25 3		-			50 3
1 h	15 0	20 0					0 -
2 h	10 -	0 -					L +
3 h	5	-					
4 h	5						
5 h	0						
5 h:	L -	L -	L -	L -	L +	L -	L + + +
	A + +	A + +	A +	A +	A +	A +	A -

nur noch in den beiden Normalseren (1 u. 2) und dem verdünnten Immunserum (7) morphologisch annähernd normal aussehende Sporozoiten

enthalten, die jedoch in letzterem sehr viel schneller verschwanden. Nach 2 bis 5 Stunden waren auch in den Normalseren (1 u. 2) sämtliche Sporozoiten pathologisch verändert.

Etwa parallel zur Abnahme der M - Werte verlief die Motilität. Auch hier trat im Serum (3) (12 Tage p.i.) sowie in dem inaktivierten Immuns serum (6) - nach anfänglich relativ lange unveränderten Werten - ein rapider Abfall auf. Wie in den vorangegangenen Versuchen erreichte die Bewegungsrate in allen Seren eher den Nullpunkt als die M - Werte.

In dem verdünnten Immuns serum (7) waren von einigen der pathologisch veränderten Sporozoiten nach einer Stunde nur noch die leeren Hüllen zu sehen, welche die gleiche Gestalt hatten wie die pathologischen Formen. Ein plötzliches oder allmähliches Austreten des Plasmas konnte nicht beobachtet werden. Nach 5 Stunden waren alle Sporozoiten lysiert.

Nach einer Stunde war auch in dem unverdünnten, unbehandelten Immuns serum (5) Lysis bei ca. 30 % der Sporozoiten in der beschriebenen Weise eingetreten, in den anderen Seren überhaupt nicht.

In fast allen Seren - außer in dem verdünnten Immuns serum (7) - wurde Agglutination in verschiedenen Graden gesehen. Oft waren schon wenige Minuten nach Kontakt mit dem Serum mehrere Sporozoiten miteinander verklebt und befreiten sich zum Teil durch Fortbewegung wieder. Im Laufe des Versuches wurden diese Klumpen größer und zahlreicher, besonders in den beiden Normalseren (1 u. 2).

Versuch 28 Sporozoiten wurden in Seren verschiedener Tierarten bei 39° C inkubiert (Tabelle 27).

Die ersten morphologischen Veränderungen setzten meist schon nach wenigen Sekunden ein und entsprachen den in Versuch 27 geschilderten (Abb. Ib; 29, 30, 31). Auch hier wurden weniger stark veränderte, aber bewegliche Sporozoiten in die M - Werte einbezogen.

Am schnellsten gingen die Sporozoiten in Serum vom Rind, Kalb und der Ratte zugrunde. Bei zunehmendem Verlust an Beweglichkeit fielen die M - Werte schon vor Ablauf einer Minute auf Null ab. Nach

eineinhalb Minuten waren auch im Hundeserum, nach 2 bis 3 Minuten in den Seren von Pferd, Schwein und Maus nur noch pathologisch stark veränderte und unbewegliche Sporozoiten zu sehen. Nach 5 bis 7 Minuten konnten im Schaf- und Ziegenserum ebenfalls keine morphologisch normalen und beweglichen Sporozoiten mehr beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren in dem Küken serum noch etwa 50 % weitgehend unverändert und bewegten sich noch lebhaft. Kurz darauf kam jedoch auch hier die Motilität zum Erliegen, und der M - Wert erreichte nach 20 Minuten den Nullpunkt.

Die Vorgänge der Lysis setzten - wie in Versuch 27 - erst bei pathologisch stark veränderten Sporozoiten ein. Nach Ablauf einer Stunde waren in den Seren von Kuh, Kalb, Maus und Küken jeweils etwa 30 % lysiert, in Rattenserum mehr als die Hälfte. Dagegen war es zu dieser Zeit in den übrigen Seren nicht zur Lysis gekommen.

Agglutination wurde - mit Ausnahme des Küken serums - in allen Seren beobachtet. Am stärksten trat sie in dem Hundeserum auf; hier waren innerhalb weniger Minuten fast sämtliche Sporozoiten zu so großen Klumpen verklebt, daß sie darin nicht mehr gezählt werden konnten. Schätzungsweise waren es oft über 100. Ähnlich, aber doch nicht in diesem Ausmaß waren die Vorgänge nach einer Stunde in den Seren von Rind, Kalb und Ziege, während in den übrigen Tierseren nur geringgradige Agglutination stattgefunden hatte.

Tabelle 27

Lebensdauer von Sporozoiten in Serum verschiedener Tierarten
bei 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, L = Lysis,

A = Agglutination (siehe S.27-29).

Zeit	Pferd	Kuh	Kalb	Schaf	Ziege	Schwein	Hund	Ratte	Maus	Küken
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
direkt	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
10 Sek.	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
20 Sek.	100 5	50 4	90 5	100 5	100 5	100 5	100 5	80 4	100 5	100 5
30 Sek.	100 5	10 1	80 4	100 5	100 5	90 5	80 4	20 1	100 5	100 5
40 Sek.	95 4	0 -	40 4	100 5	100 5	80 4	70 3	0 -	100 5	100 5
50 Sek.	90 4	-	5 1	100 4	100 4	40 3	60 3	-	80 3	100 5
60 Sek.	80 4	-	0 -	100 4	100 4	30 3	40 1	-	30 5	100 4
90 Sek.	30 2	-	-	90 4	70 4	10 0	0	-	10 0	100 4
2 Min.	10 1	-	-	85 4	60 4	0 -	-	-	0 -	100 4
3 Min.	0 -	-	-	40 3	50 4	-	-	-	-	95 4
4 Min.	-	-	-	20 1	20 1	-	-	-	-	95 2
5 Min.	-	-	-	0 -	20 1	-	-	-	-	90 4
6 Min.	-	-	-	-	5 0	-	-	-	-	70 4
7 Min.	-	-	-	-	0 -	-	-	-	-	50 4
8 Min.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40 4
9 Min.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20 1
10 Min.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 0
20 Min.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 -
1 h	L - A +	L + A + +	L + A + +	L - A +	L - A + +	L - A +	L - A + + +	L + + A +	L + A +	L + A -

Versuch 29 Sporozoiten wurden in einem Zellkulturmedium bei 39° C inkubiert (Tabelle 28).

Nach 10 Minuten begannen die ersten morphologischen Veränderungen gleicher Art wie in den Versuchen 27 und 28. Neben etwa 10 % pathologischen und unbeweglichen Formen (Abb. Ib; 30, 31) waren auch einige weniger stark veränderte, jedoch bewegliche Sporozoiten zu sehen, die mit in den M - Wert einbezogen wurden. Nach 30 Minuten waren von 90 % der nun nicht mehr sehr beweglichen Sporozoiten nur noch wenige morphologisch völlig unverändert. Nach 4 Stunden waren etwa zu gleichen Teilen unbewegliche pathologische Formen sowie bewegliche, weniger stark veränderte Sporozoiten vorhanden. Der M - Wert fiel bis zur 8. Stunde weiter auf 20 %; bis zu diesem Zeitpunkt hatte auch die Bewegungsintensität allmählich nachgelassen.

Unter den pathologischen Formen wurden von der 4. Stunde an vermehrt leere Hüllen von gleichem Aussehen wie in Versuch 27 und 28 gesehen. Nach 8 Stunden waren etwa 30 % auf diese Weise lysiert.

Zu einer geringgradigen Agglutination kam es schon nach etwa 20 Minuten. Die Verklumpung nahm bis zur 8. Stunde erheblich zu (A + +).

Versuch 30 Sporozoiten wurden in den Einzelbestandteilen des in Versuch 29 eingesetzten Zellkulturmediums bei 39° C inkubiert (Tabelle 28).

In TC 199 mit und ohne Zusatz 2 %iger antibiotischer Lösung waren nach 3 Stunden noch alle Sporozoiten morphologisch unverändert und gut beweglich. Die M - Werte fielen dann in beiden Medien gleichmäßig und allmählich auf 70 % bis zur 8. Stunde ab. Die Intensität der Bewegungen ließ ebenfalls langsam nach, im Medium mit Antibiotikagehalt etwas schneller als in TC 199 ohne einen Zusatz.

In der Antibiotika - Lösung kam die Motilität innerhalb von 5 Minuten fast völlig zum Erliegen, wurde aber bis zur 30. Minute langsam wieder intensiver. Von der 3. Stunde an ließ die Beweglichkeit allmählich erneut nach. Zu diesem Zeitpunkt waren die ersten

Tabelle 28

Lebensdauer von Sporozoiten in einem Zellkulturmedium sowie in dessen Einzelbestandteilen bei 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, L = Lysis,

A = Agglutination (siehe S.27-29).

Zeit	Zell- kultur- medium		TC 199		TC 199 Antibio- m. 2 % tika- antibiot. Lösung		Fetales Kälber- serum		Inaktiv. Kälber- serum		Inaktiv. Kanin- chen- serum	
	M	BR	M	BR	M	BR	M	BR	M	BR	M	BR
direkt	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5	100	5
30 Sek.	100	5	100	5	100	5	100	5	100	4	100	5
1 Min.	100	5	100	5	100	5	100	3	100	5	100	5
5 Min.	100	4	100	5	100	5	100	1	90	4	100	4
10 Min.	90	4	100	5	100	5	100	2	80	3	70	4
20 Min.	90	4	100	5	100	5	100	3	60	3	40	2
30 Min.	90	3	100	5	100	5	100	4	50	3	30	1
1 h	75	3	100	5	100	5	100	4	40	2	10	0
2 h	65	3	100	5	100	5	100	4	20	1	10	-
3 h	65	3	100	4	100	4	90	3	0	-	0	-
4 h	50	3	95	4	95	3	80	3	-	-	-	-
5 h	40	2	90	3	90	3	60	2	L -	L +	L +	L +
6 h	30	2	85	3	85	3	60	2	A ++	A +	A +	A +
7 h	30	2	80	3	80	2	50	2				
8 h	20	1	70	2	70	2	40	2				
	L +		L -		L -		L -					
	A ++		A -		A -		A -					

pathologischen Veränderungen zu beobachten. Der M - Wert fiel bis zur 8. Stunde auf 40 % ab.

Die pathologischen Formen in TC 199 mit und ohne Zusatz von Antibiotika sowie in der Antibiotika - Lösung entsprachen ausschließlich denen in physiologischer Kochsalzlösung (z. B. Versuch 15). Lysis und Agglutination wurden nicht beobachtet.

In den drei Seren traten nach 1 bis 5 Minuten die ersten Veränderungen auf. Neben einzelnen, pathologisch stärker deformierten und unbeweglichen Formen waren auch hier - wie im Zellkulturmedium (Versuch 29) und in den Serumversuchen 27 und 28 - einige Sporozoiten nur geringfügig plumper geworden und wurden auf Grund ihrer Beweglichkeit mit im M - Wert erfaßt.

Nach 20 Minuten betrug in fetalem Kälberserum bei einem M - Wert von 60 % der Anteil an morphologisch völlig unveränderten Sporozoiten etwa die Hälfte. Zur gleichen Zeit waren im inaktivierten Kälber- und Kaninchenserum unter den 40 bis 50 % beweglichen Sporozoiten fast nur noch jene plumperen Formen zu sehen. Die M - Werte fielen in dem inaktivierten Kälberserum am stärksten ab, erreichten aber nach 3 Stunden in allen drei Seren gleichzeitig den Nullpunkt, wobei jedoch wieder im fetalen Serum morphologisch völlig unveränderte Sporozoiten am längsten zu beobachten waren.

Die Motilität war bis zur 10. Minute in allen drei Seren etwa gleich gut, kam aber dann in dem inaktivierten Kälberserum bis zum Ablauf einer Stunde wesentlich schneller zum Erliegen. Zu diesem Zeitpunkt bewegten sich die Sporozoiten in fetalem Kälberserum noch etwas lebhafter als die in dem inaktivierten Kaninchenserum, in dem nur noch einzelne Sporozoiten träge Bewegungen ausführten.

Lysis trat in fetalem Kälberserum nicht ein. Dagegen war nach 3 Stunden in den beiden anderen Seren jeweils ein Drittel der pathologischen Formen lysiert.

Agglutination war in allen drei Seren schon nach wenigen Minuten eingetreten und nahm bis zur 2. und 3. Stunde allmählich zu, am stärksten in dem fetalen Kälberserum.

Versuch 31 Sporozoiten wurden in TC 199, das entweder ein oder zwei Seren in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt, bei 39° C inkubiert (Tabelle 29).

Auch in diesen Medien traten nach kurzer Zeit (etwa 5 Minuten) gleiche morphologische Veränderungen wie in den Versuchen 27 bis 30

auf, wobei wiederum die etwas plumper gewordenen, jedoch beweglichen Sporoziten zusammen mit den morphologisch völlig unveränderten im M - Wert erfaßt wurden.

Nach 30 Minuten waren in sämtlichen Medien zwar noch M - Werte von 70 bis 80 % vorhanden; diese Sporoziten sahen jedoch alle nicht mehr völlig normal aus, unterschieden sich aber deutlich von den restlichen pathologischen und unbeweglichen Formen.

Im weiteren Verlauf fiel der M - Wert in dem Medium mit 5 % fetalem Kälberserum nur noch unwesentlich ab. Nach 6 Stunden wurden plötzlich wieder völlig normal aussehende Sporoziten sichtbar, nach 8 Stunden hatten insgesamt 70 % der Sporoziten ihre ursprüngliche Gestalt wieder.

In den anderen Medien fielen nach 2 bis 3 Stunden die M - Werte allmählich ab, am geringsten in dem Medium mit 5 % inaktiviertem Kaninchenserum (M = 50 nach 8 Stunden), am stärksten in TC 199 mit 20 % inaktiviertem Kälberserum (10 % nach 8 Stunden). Bei den anderen Serumzusätzen waren bis zur 8. Stunde etwa 70 bis 90 % der Sporoziten pathologisch stark verändert.

Auch bei einem Zusatz von 10 % inaktiviertem Kälberserum und 5 % inaktiviertem Kaninchenserum wurden zwischen der 6. und 8. Stunde wieder einige völlig normal aussehende Sporoziten beobachtet (in Kälberserum etwa ein Drittel, in Kaninchenserum gut die Hälfte).

Etwa in gleichem Grade wie die M - Werte wurde auch die Motilität von der 5. Minute an allmählich geringer. In TC 199 mit 10 % inaktiviertem Kälberserum sowie bei allen Serumkonzentrationen von 20 % wurden nach 6 bis 8 Stunden nur noch vereinzelt träge Bewegungen gesehen. Dagegen hatte bis zu diesem Zeitpunkt in TC 199 mit 5 % fetalem Kälberserum die Bewegungsintensität wieder bedeutend zugenommen, ebenso wie im Medium mit 5 % Kaninchenserum vorübergehend und geringgradig nach 5 bis 6 Stunden.

Lysis setzte erst nach etwa 4 bis 5 Stunden ein und war nur an bereits pathologisch stark veränderten Sporoziten zu beobachten. Agglutination begann dagegen schon nach wenigen Minuten, wobei sowohl

Tabelle 29

Lebensdauer von Sporozoiten in TC 199 (Difco) mit Serum-
zusätzen bei 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate, L = Lysis,

A = Agglutination (siehe S.27-29)

Zeit	TC 199 mit Zusatz von						
	5 % fetalem Kälber- serum	10 % inakt. Kälber- serum	5 % inakt. Kanin. serum	5 % fet. +10 % in- akt. Käl- ber- serum	20 % in-fetalem Kälber- serum	20 % inakt. Kälber- serum	20 % inakt. Kanin. serum
	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR	M BR
direkt	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
30 Sek.	100 5	100 4	100 5	100 5	100 5	100 5	100 5
1 Min.	100 5	100 4	100 5	100 4	100 4	100 5	100 5
5 Min.	100 4	100 3	100 4	100 4	100 4	100 4	100 3
10 Min.	100 3	80 3	90 4	100 3	100 3	80 3	100 3
20 Min.	100 3	80 2	80 3	80 2	90 2	80 3	90 3
30 Min.	80 2	80 2	80 2	70 2	70 2	70 2	80 3
1 h	80 2	80 2	80 2	70 2	70 2	70 2	70 2
2 h	80 2	70 2	80 2	70 2	70 2	50 2	60 2
3 h	70 2	60 2	70 2	70 2	60 2	40 2	50 2
4 h	70 2	50 2	60 2	60 2	60 2	30 2	30 2
5 h	70 2	50 2	60 3	50 2	50 2	20 2	30 2
6 h	70 3	40 2	60 3	40 2	45 1	20 2	20 2
7 h	70 4	35 2	60 2	20 2	40 1	10 1	20 1
8 h	70 4	15 1	50 2	20 2	30 1	10 1	20 1
	L -	L ++	L +	L ++	L -	L ++	L +
	A -	A +	A ++	A +	A -	A +	A ++

bewegliche als auch unbewegliche Sporozoiten miteinander verklump-
ten.

Weder Lysis noch Agglutination wurden in den Medien mit fetalem
Kälberserum (5 und 20 %) beobachtet. In allen drei Proben mit Zu-

satz von inaktiviertem Kälberserum war nach 8 Stunden über die Hälfte der Sporoziten wie in den Versuchen 27 bis 30 lysiert sowie eine schwache Agglutination zu sehen. Nach der gleichen Zeit war in den Medien mit inaktiviertem Kaninchenserum etwa ein Drittel lysiert. Die Agglutination war in TC 199 mit 5 und 20 % Zusatz von Kaninchenserum am stärksten.

9. Unterschiedliches Alter der Oocysten

Versuch 32 Sporoziten aus verschieden alten Oocysten wurden in physiologischer Kochsalzlösung bei 39° C inkubiert (Tabelle 30).

Innerhalb der ersten 3 Stunden blieben in allen Medien sämtliche Sporoziten morphologisch unverändert. Im weiteren Verlauf fielen die M - Werte bis zur 8. Stunde allmählich und gleichmäßig ab. Danach gingen die pathologischen Veränderungen bei 12 Monate alten Sporoziten wesentlich schneller von statten. Der M - Wert erreichte hier nach 17 Stunden den Nullpunkt, in den drei anderen Proben erst nach 22 und 24 Stunden. Die pathologischen Veränderungen waren die gleichen wie in Versuch 15 u. a. (in physiologischer Kochsalzlösung).

Die Motilität ließ zwischen der 2. und 3. Stunde bei den 6 und 12 Monate alten Sporoziten etwas stärker nach. Bei den jüngsten Sporoziten war es nach 11 Stunden endgültig zum Bewegungsstillstand gekommen, in den drei anderen Proben bereits nach 9 bis 10 Stunden.

Tabelle 30

Lebensdauer von Sporozoiten aus unterschiedlich alten Oocysten
in physiologischer Kochsalzlösung bei 39° C

M = Morphologie, BR = Bewegungsrate (siehe S.27/28)

h	Alter der Oocystenkultur			
	1 Monat	3 Monate	6 Monate	12 Monate
	M BR	M BR	M BR	M BR
1	100 5	100 5	100 5	100 5
2	100 4	100 4	100 4	100 4
3	100 4	100 4	100 3	100 3
4	95 3	95 3	90 3	90 3
5	90 3	90 3	80 3	90 3
6	85 2	90 2	80 2	80 2
7	80 2	80 1	75 2	70 1
8	75 2	75 1	70 2	65 1
9	70 1	65 0	60 1	55 0
10	65 1	60 -	50 0	40 -
11	60 0	50	45 -	30
12	60 -	50	40	25
13	55	40	40	20
14	50	40	35	10
15	40	40	35	10
16	35	30	25	5
17	25	20	15	0
18	25	15	10	-
19	20	10	10	
20	15	10	10	
21	10	10	5	
22	5	5	0	
23	5	0	-	
24	0	-		

Abbildung I a

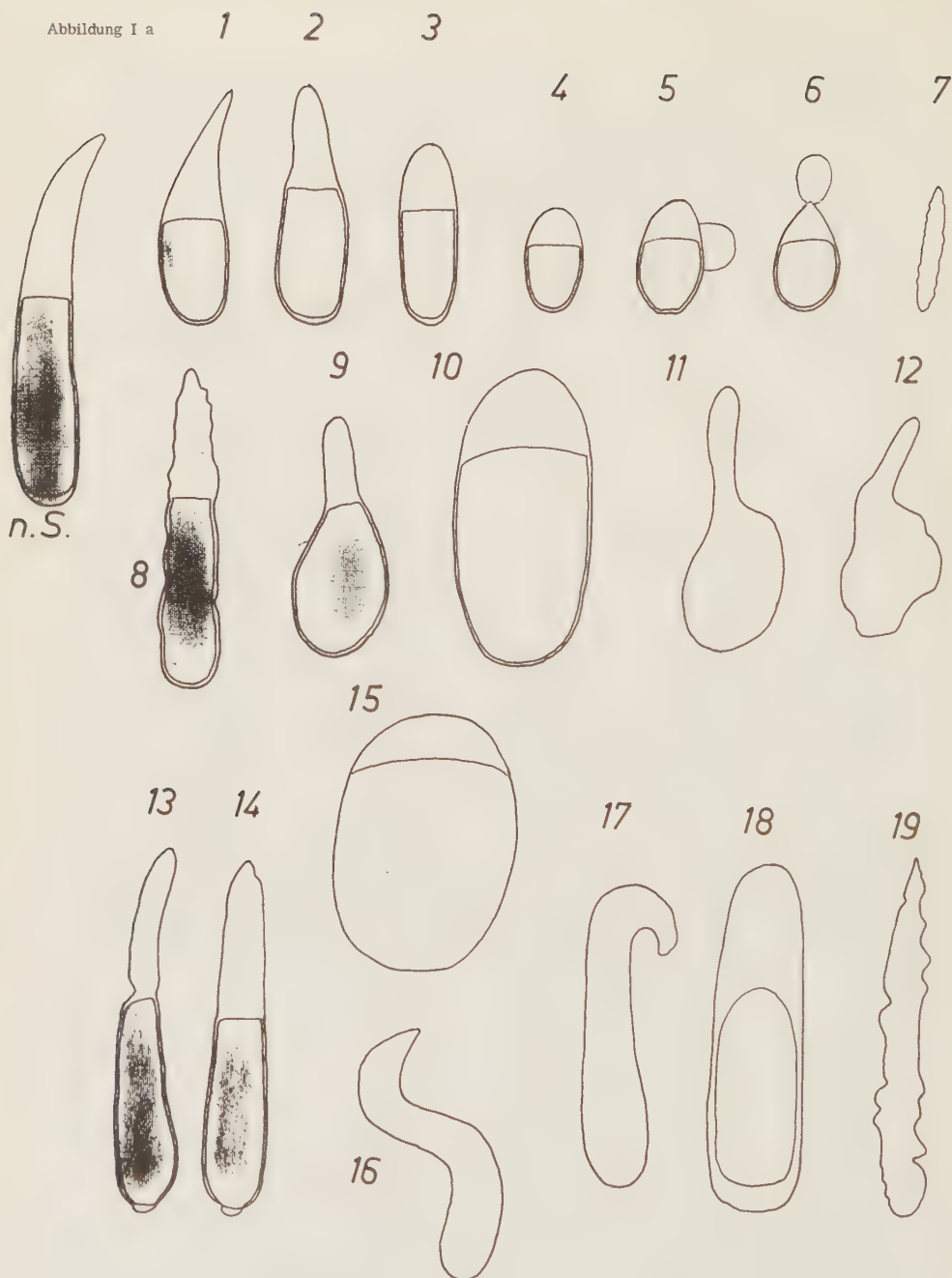
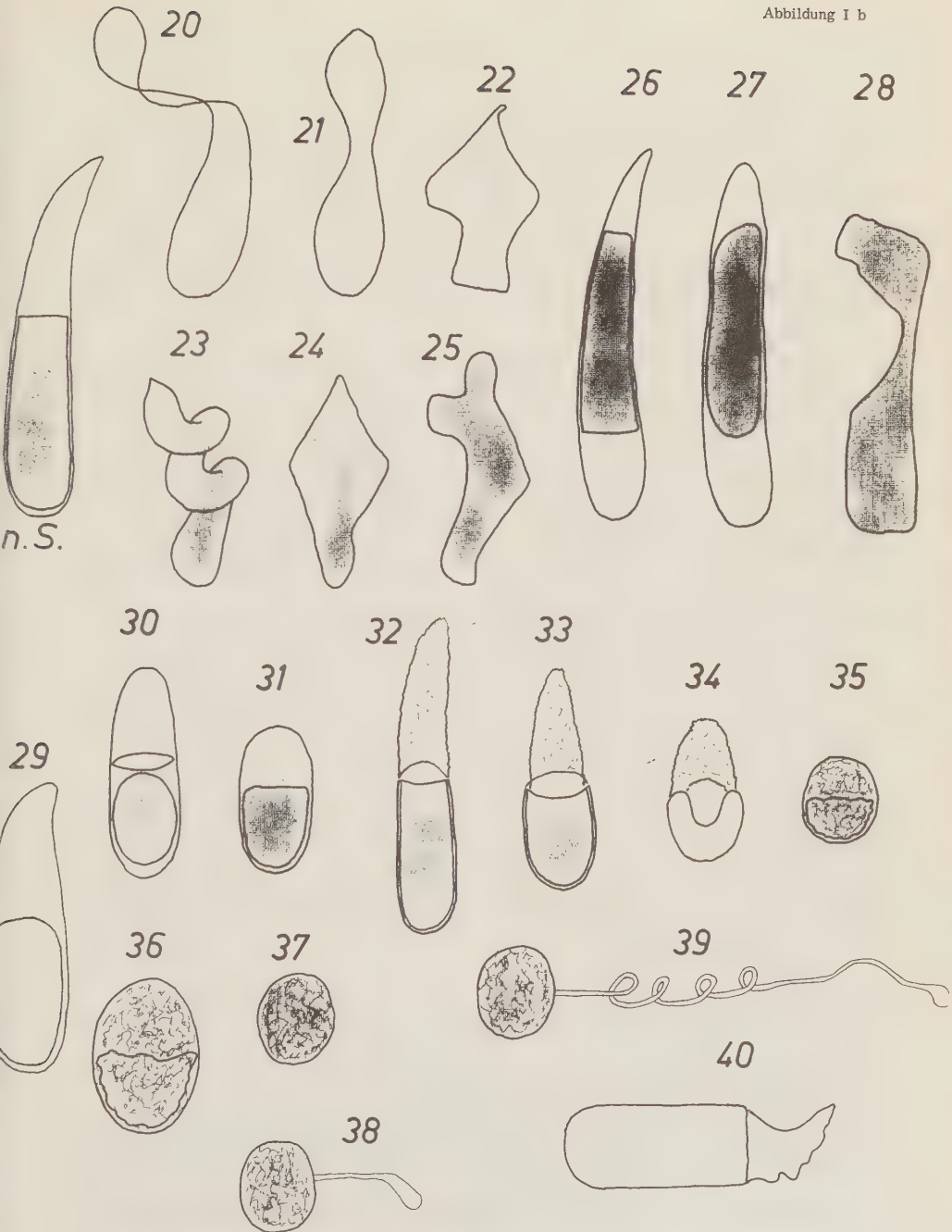


Abbildung I a und b: Formveränderungen der Sporozoiten nach Inkubation
in den einzelnen Medien bzw. nach der Zentrifugation.

n. S. = normaler Sporozoit



V. DISKUSSION

Voraussetzung für die Durchführung der einzelnen Versuche mit Sporozoiten war eine zuverlässige Excystationsmethode. Es wurden größere Mengen von Sporozoiten benötigt, die möglichst synchron und innerhalb kurzer Zeit ausschlüpfen. Bei einer sich über längere Zeit erstreckenden und allmählich ablaufenden Excystation war eine vorzeitige Schädigung der zuerst ausgeschlüpfen Sporozoiten durch das Excystationsmedium zu befürchten.

Die ersten Vorversuche stützten sich auf das Verfahren von ROSE (1959), die mit mechanisch befreiten Sporocysten der gleichen Eimeria-Art arbeitete und mit 0,1 % Trypsin bei einem pH Wert von 7,8 und bei einer Inkubationstemperatur von 37° C befriedigende Ergebnisse erzielte. Diese Methode erwies sich jedoch hier als unzuverlässig und nicht ausreichend. Die Ergebnisse waren sehr ungleichmäßig. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten excystierten 20 bis höchstens 50 % der Sporozoiten. Die Angaben anderer Autoren stimmen in etwa mit diesen Befunden überein. DORAN und FARR (1962 a u. b) fanden bei E. acervulina- und E. tenella - Sporocysten nach Einwirkung von 0,25 % Trypsin nur wenige oder höchstens 30 % freie Sporozoiten, und HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969) berichten, daß es bei CO₂ - vorbehandelten Oocysten verschiedener Eimeria - Arten nach Inkubation mit 0,25 bis 0,5 % Trypsin zu einer sehr schlechten oder zu gar keiner Excystation kam. Dagegen hatten LANDERS und COLLEY (1964) mit 0,5 % Trypsin befriedigende Excystationsraten bei CO₂ - vorbehandelten E. nieschulzi - Oocysten.

Im Rahmen der eigenen Versuche zeigte es sich, daß Trypsin in 0,2 %iger Konzentration etwas wirksamer als 0,1 % war. Höhere Konzentrationen verbesserten die Excystation nicht. Bei Verwendung einer 0,2 %igen Trypsinlösung excystierten maximal ca. 60 % in 1 bis 3 Stunden. Dieser Prozentsatz wurde jedoch nicht immer erreicht; die Ergebnisse waren - wie auch mit 0,1 % Trypsin - sehr ungleichmäßig.

Störend war vor allem, daß während der Beobachtung von bereits

freien Sporozoiten auf dem Objektträger nach Auflage eines Deckglases laufend neue Sporozoiten excystierten. Um die freien Sporozoiten zu isolieren, wurden nach der von WAGENBACH (1969) beschriebenen Versuchsanordnung zermörserte Oocysten, die etwa eine Stunde in 0,2 %iger Trypsinlösung inkubiert waren, durch Glasperlen geleitet. Zu diesem Zeitpunkt hatten in der Regel etwa 30 bis 60 % der Sporozoiten excystiert. Oocysten, Oocystenhüllen und Detritus blieben an den Glasperlen haften, jedoch erschienen im Filtrat neben den excystierten Sporozoiten große Mengen von Sporocysten. Nach den Angaben von WAGENBACH (1969) hatten außer den Sporozoiten ebenfalls einige Sporocysten die Glasperlen passiert. Er berichtet jedoch von Excystationsraten von 90 bis 95 %. Es muß daher angenommen werden, daß die Funktion der Glasperlensäulen bezüglich eines reinen Sporozoitenfiltrats hauptsächlich von der Excystation abhängig ist. Je mehr Sporozoiten ausgeschlüpft sind, desto weniger Sporocysten mit nicht excystierten Sporozoiten kommen als Verunreiniger des Filtrats in Frage.

Nach diesen Ergebnissen war die Methode von WAGENBACH (1969) nicht geeignet zur Isolierung excystierter Sporozoiten, erwies sich jedoch als brauchbar zur Reinigung von zermörserten Oocystensuspensionen und Anreicherung von Sporocysten.

Wurde anstelle von Glasperlen Watte zur Filtration verwendet, so ging der Durchlauf schneller von statten, und die Sporocystenausbeute war größer. Eine klare, fast farblose Sporocystensuspension wurde gewonnen, wenn die zermörserten Oocysten vor dem Filtern mit reichlich physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurden. Eine anschließende Konzentrierung der Sporocysten erfolgte durch Zentrifugation.

Es stellte sich heraus, daß die Sporozoiten in 0,2 %iger Trypsinlösung in einem pH Bereich von 4,5 bis 9,5 umso schlechter excystierten, je reiner und klarer das Sporocystenfiltrat war. Daraus ließe sich vermuten, daß sich in den Oocysten oder an den Oocystenhüllen gewisse Substanzen befinden, die nach dem Zermörsern in Lösung gehen und mit Trypsin zusammen als wirksame Faktoren bei der Excystation beteiligt sind. Durch reichlichen und wiederholten Zusatz von

physiologischer Kochsalzlösung werden diese Substanzen stark verdünnt bzw. ausgewaschen und damit unwirksam.

Bei dem Versuch, im ExcystationsmEDIUM neben Trypsin auch Galle einzusetzen, ergaben sich nach Zusatz von 2 % Kaninchengalle gute Excystationsraten, die mit steigender Konzentration höher wurden und von 8 % Gallezusatz an einen optimalen Wert von 95 % nach 30 Minuten erreichten. Die von den anderen Autoren angegebenen Gallekonzentrationen lagen mit 5 bis 10 % ebenfalls in diesem Bereich, während die Angaben über die Behandlungsdauer und die Prozentsätze excystierter Sporozoiten sehr unterschiedlich sind. Dies kann vermutlich auf Unterschiede zwischen den einzelnen Eimeria - Species zurückgeführt werden.

Die Wirkung des hier verwendeten Excystationsmediums war in einem Bereich von pH 5,5 bis 8,5 gleich gut. Daher war es nicht erforderlich, das Medium auf so genaue pH Werte einzustellen, wie sie in der Literatur zu finden sind. Diese Ergebnisse stehen nicht ganz in Einklang mit denen von HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969), die sich näher mit dem Einfluß verschiedener pH Werte auf die Excystation befaßten und ein Optimum bei pH 7,5 bis 8,5 fanden, während unterhalb und oberhalb dieses Bereiches (pH 6,0 bzw. 10,0) niedrigere Excystationsraten erreicht wurden.

Wie aus der Tabelle 1 (S. 7) hervorgeht, wurde meistens Galle verwendet, die vom Wirtstier der jeweils untersuchten Eimeria - Art stammte. Zum Teil wurden auch mit anderen Gallearten gute Ergebnisse erzielt. Systematische Untersuchungen hierzu fehlen. In den eigenen Versuchen erwies sich Galle vom Kaninchen, Rind, Kalb und Schwein in einer Konzentration von 8 % in Kombination mit 0,2 % Trypsin als gleichermaßen wirksam. Aus den auf Seite 22 angegebenen Gründen wurde für die weiteren Versuche immer Rindergalle verwendet.

Die Ergebnisse aus Versuch 3 und 4 zeigen, daß mit 8 % Galle ohne Trypsin in einem Bereich von pH 6,5 bis 9,0 zum Teil relativ hohe Excystationsraten erreichbar waren; bei pH 7,0 und 7,5 excystierten sogar mit 95 % genau so viele Sporozoiten wie bei einem Zusatz von

Trypsin, allerdings erst nach 2 bis 3 Stunden. In unverdünnter Galle lag der Prozentsatz nach 5 Stunden bei 40 %.

Auch LOTZE und LEEK (1960) gelang mit unverdünnter Galle bei 2,5 Stunden langer Inkubation von mit Speichel oder Steapsin vorbehandelten E. faurei -, E. arloingi - und E. ninakohlyakimovi - Oocysten eine Excystation; prozentuale Angaben liegen nicht vor. Im Gegensatz dazu schildern HIBBERT, HAMMOND und SIMMONS (1969), daß Galle oder Gallensalze in Konzentrationen bis zu 50 % bei keiner der 11 untersuchten Eimeria - Arten Excystation hervorrief. Nur wenn die Galle einen hohen Gehalt an Bakterien und Pilzen hatte, schlüpften ca. 3 % E. bovis - und 56 % E. ellipsoidalis - Sporozoiten aus. Aus den Untersuchungen von ROBERTS, HAMMOND und SPEER (1970) geht hervor, daß bei Verwendung von Gallensalzen ohne Trypsin zwar in vielen Sporocysten Sporozoitenbewegung festzustellen, aber keine Excystation stattfand. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde kann nicht gegeben werden.

JACKSON (1962) beschreibt, daß E. arloingi - Sporozoiten aus CO₂ - vorbehandelten Oocysten gut excystierten, wenn zuerst Schafgalle und danach Trypsin einwirkten. Bei der umgekehrten Reihenfolge zeigten die beiden Faktoren keine Wirkung. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten DORAN und FARR (1962 a): wurden E. acervulina - Sporocysten zuerst in Kükengalle inkubiert und später Trypsin zugesetzt, so excystierten kurz danach 85 bis 90 % der Sporozoiten, während nach Gallezusatz zu den anfänglich in Trypsinlösung inkubierten Sporocysten weniger als 50 % ausschlüpfen. In den eigenen Versuchen wurde jedoch gefunden, daß bei E. stiedai - Sporocysten die Reihenfolge der Trypsin - Galle - Einwirkung keine Rolle spielt. Es excystierten jeweils 95 % der Sporozoiten, gleichgültig ob zuerst Trypsin oder Galle eingewirkt hatte und eine halbe Stunde später der fehlende Faktor zugegeben wurde.

Es wäre naheliegend, die Ergebnisse von JACKSON (1962) sowie DORAN und FARR (1962 a) damit zu erklären, daß bei den genannten Tierarten in vivo die beiden Komponenten Galle und Trypsin in der entsprechenden Reihenfolge einwirken würden. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß sowohl beim Schaf als auch beim Huhn der Ductus

choledochus und der Ductus pancreaticus an der gleichen Stelle ins Duodenum münden, während beim Kaninchen, bei dem die Reihenfolge der Einwirkung in vitro keine Rolle spielt, die Einmündungsstelle des Ductus pancreaticus ca. 40 cm hinter der des Ductus choledochus liegt.

NYBERG und HAMMOND (1964) sowie DORAN und VETTERLING (1967 b) bewahrten ihre Excystationsmédien bei -20° bzw. -40° C auf, Angaben über die Dauer der Haltbarkeit bei diesen Temperaturen werden nicht gemacht. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei $+4^{\circ}$ C behielten nach eigenen Untersuchungen Trypsinlösung und Rindergalle mindestens 3 Monate lang ihre volle Wirksamkeit. Trypsinlösung war außerdem - bei Zimmertemperatur aufbewahrt - mindestens 4 Wochen lang wirksam. Es ist demnach nicht notwendig, zur Excystation frische Galle und frisch angesetzte Trypsinlösung zu verwenden. Auch ein Einfrieren auf -20° bis -40° C erweist sich damit eventuell als überflüssig, es sei denn, daß auf diese Weise eine noch längere Haltbarkeit der Médien erreicht und die erwähnten mikrobiellen Veränderungen verhindert werden sollen.

Als Sporulationsmedium wird in der neueren Literatur nahezu ausschließlich Kaliumbichromat angegeben. Lediglich JACKSON (1962) berichtet über schlechtere Excystationsergebnisse, verglichen mit Oocysten, die in reinem Wasser sporuliert hatten. Ohne daß dafür in der vorliegenden Literatur experimentelle Ergebnisse angeführt werden, wird jedoch stets vor einer weiteren Verwendung der Oocysten zu in vitro und in vivo Versuchen das Kaliumbichromat gründlich ausgewaschen. Es besteht nur eine mündliche Überlieferung, daß experimentelle Infektionen mit Oocystensuspensionen in Kaliumbichromat - Lösung nicht gelingen sollen. Die Ergebnisse von Versuch 6, 10 und 19 zeigen, daß eine Excystation in Kaliumbichromat - Lösung mit höheren Konzentrationen als 0,1 % nicht erfolgt und Konzentrationen über 0,0008 % die Sporozoen in Abhängigkeit von der Zeit irreversibel schädigen. Die gleiche schädigende Wirkung - in Abhängigkeit von der Zeit - übt das Kaliumbichromat auf Sporozoen auch aus, wenn sie sich noch in den Sporocysten befinden. Es ist deshalb denkbar, daß bei einem Unterlassen des Auswaschens von Kaliumbichromat bei Infektionsver-

suchen je nach Verdünnung der Oocystensuspension im Magen - Darm - Trakt des Wirtes entweder die Excystation völlig unterbleibt oder die excystierten Sporozoiten noch vor dem Eindringen in die Wirtszelle soweit geschädigt werden, daß eine Weiterentwicklung nicht mehr möglich ist.

Im Widerspruch zu dieser Theorie stehen die Ergebnisse von BEACH und CORL (1925), die nach Inoculation von Küken mit "Eimeria avium" - Oocysten den Tieren zur Behandlung Trinkwasser mit 0,1 und 0,2 % Kaliumbichromat - Zusatz vorsetzten und dabei keinen Einfluß auf eine Infektion feststellten. Drei Gesichtspunkte könnten als Erklärung für dieses Versagen angeführt werden:

1. die in vitro noch wirksame Lösung wurde durch den Magen - Darm - Inhalt bis zur Unwirksamkeit verdünnt;
2. das Kaliumbichromat war schon, bevor es am Wirkungsort angelangt war, biologisch abgebaut oder verbraucht worden;
3. die Sporozoiten hatten zu Beginn der Medikation (Wasseraufnahme ad libitum) bereits excystiert, waren in die Darmzellen eingedrungen und damit der Einwirkungsmöglichkeit des Kaliumbichromat entzogen.

Zur endgültigen Erklärung wären weitere systematische Untersuchungen vorzunehmen.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß ältere Oocysten in Abhängigkeit von der Temperatur eine geringere Infektiosität aufweisen (SCHNEIDER, AYENI und DÜRR, 1971). DORAN und VETTERLING (1969 a) fanden als Ursache für eine Abnahme der Infektiosität von E. meleagridis - Sporozoiten aus älteren Oocysten, daß viele vor oder kurz nach der Excystation zugrunde gingen oder unfähig waren, sich nach dem Eindringen in Zellkulturen weiterzuentwickeln. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch DORAN (1970 c) und LONG (1970). Letzterer beschreibt, daß auch die Excystationsraten bei jüngeren Oocysten höher lagen als bei älteren.

Die eigenen Ergebnisse zeigen, daß Sporozoiten aus 1, 3, 6 und 12 Monate alten Oocysten gleich gut excystierten. Erst bei Verwendung

höher konzentrierter Kochsalzlösungen war an Hand der Excystationsraten eine deutliche Altersabhängigkeit festzustellen. In physiologischer Kochsalzlösung bei 39⁰ C waren bei 1 bis 6 Monate alten Sporozoiten bezüglich der Lebensdauer keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Dagegen ließ bei einem Alter von 12 Monaten die Vitalität deutlich früher nach.

Etwa damit übereinstimmende Ergebnisse bei Infektionsversuchen am Wirtstier bzw. an der Zellkultur erzielten DORAN und VETTERLING (1969 a) mit E. meleagridis-, DORAN (1970 c) mit E. adenoides- und E. tenella- sowie LONG (1970) mit E. tenella- Sporozoiten.

Über die Resistenz von Sporocysten liegen in der Literatur nur wenige Angaben vor. JACKSON (1964) berichtet, daß E. arloingi - Sporocysten bei + 4⁰ C ihre Lebensfähigkeit "viele Wochen lang" behielten. KOUWENHOVEN (1967) bewahrte E. tenella - Sporocysten unter Gefrierschutz bei - 196⁰ C auf und stellte fest, daß sie - im Gegensatz zu Oocysten - nach 24 Stunden noch voll infektiösfähig waren. DORAN und VETTERLING (1968 a und 1969 b) stellten nach Inoculation von E. tenella- und E. meleagridis - Sporocysten, Sporozoiten sowie Oocysten, die unter gleichen Bedingungen 1 bis 4 Monate tiefgeköhlt waren, fest, daß die Sporozoiten noch genauso infektiöstüchtig waren wie frisch excystierte; Sporocysten riefen dagegen weniger starke, Oocysten überhaupt keine Infektionen hervor.

In den eigenen Versuchen blieb die Vitalität der E. stiedai - Sporocysten bei Aufbewahrung bei + 4⁰ C 3 Wochen lang unverändert erhalten. Erst danach stellten sich die ersten Verluste ein, die sich in allmählich niedriger werdenden Excystationsraten bemerkbar machten. Bei 24⁰ C war die Lebensdauer etwas und bei 39⁰ C erheblich geringer. Wie bei den Oocysten wäre vermutlich auch hier die Ursache in einer Stoffwechselsteigerung bei höheren Temperaturen zu suchen (AYENI und DÜRR, 1971). Bezüglich der verminderten Lebensdauer in Aqua dest. bei + 4⁰ C gegenüber der in physiologischer Kochsalzlösung bei der gleichen Temperatur kann keine genaue Erklärung gegeben werden. Eine bakterielle Verunreinigung ist auszuschließen. Da

an den Sporocysten mikroskopisch keine Veränderungen festzustellen waren, ist auch ein Eindringen des Wassers durch die Sporocystenhüllen nicht sehr wahrscheinlich. Dagegen scheinen diese auf Grund der Ergebnisse von Versuch 10 eine gewisse Permeabilität gegenüber Kaliumbichromat zu haben, ebenso auch gegenüber höherprozentigen Kochsalzlösungen, nach deren Einwirkung in zahlreichen Sporocysten geschrumpfte Sporozoiten zu sehen waren.

Im Vergleich zu Oocysten (SCHNEIDER, AYENI und DÜRR, 1971) waren Sporocysten und Sporozoiten gegen Eintrocknung weit weniger resistent.

Im Rahmen der Prüfung der Lebensdauer von Sporozoiten in verschiedenen Medien ist bei den eigenen Ergebnissen das Verhalten der Sporozoiten in physiologischer Kochsalzlösung als normal zugrundegelegt. Ebenso wie die Sporocysten waren auch die Sporozoiten in niedrigen Temperaturbereichen ($+ 4^{\circ}$; 24° C) in physiologischer Kochsalzlösung länger lebensfähig. Die verkürzte Lebensdauer bei 39° C könnte wiederum auf eine Stoffwechselsteigerung zurückgeführt werden, bei 50° , 60° und 70° zusätzlich auf Enzym- und Eiweißschädigungen, die besonders schnell eintraten, wenn das Medium bereits auf die jeweiligen Temperaturen vorgewärmt war. Dagegen war vor dem Zugrundegehen zunächst eine gewisse Adaptation und damit verlängerte Lebensdauer zu beobachten, wenn die Sporozoiten bei Zimmertemperatur in der physiologischen Kochsalzlösung suspendiert und dann bei 50° bis 70° C inkubiert wurden. Aus den verschiedenen Versuchen mit physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur (Versuch 15, 23 und 25) sowie bei 39° C (Versuch 16, 21, 23 und 32) gingen übereinstimmende Ergebnisse hervor.

Bei einer Einstellung von physiologischer Kochsalzlösung auf unterschiedliche pH Werte wurde im Bereich von pH 5 bis 8 kein wesentlicher Einfluß auf die Lebensdauer gefunden. Es war daher durch diesen Faktor keine Beeinflussung der im folgenden bei unterschiedlichen pH Werten (pH 5,7 in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7 im ExcystationsmEDIUM oder pH 8 in den zwei Ringerlösungen) durchgeführten

Versuche zu befürchten.

In Versuch 22 (verschiedene Ringerlösungen) erwies sich physiologische Kochsalzlösung als das optimale Medium. Dies geht auch aus den Angaben von WAGENBACH (1969) hervor, der zwar seine Versuche in einer Ringerlösung durchführte, bei dem jedoch die E. tenella - Sporoziten unter sonst nahezu gleichen Bedingungen in physiologischer Kochsalzlösung bei + 1° C 4 Tage länger lebensfähig blieben.

FAYER und HAMMOND (1967) fanden, daß E. bovis - Sporoziten bei einem pH Wert von 7,4 in physiologischer Kochsalzlösung bei 39° C 6 Stunden lang beweglich blieben. Im Unterschied dazu war in den eigenen Versuchen die Motilität der Sporoziten von E. stiedai allmählich geringer geworden, jedoch erst nach 9 bis 11 Stunden zum Erliegen gekommen.

Bei den Versuchen mit unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen wurde festgestellt, daß der pH Wert der physiologischen Kochsalzlösung nach Zusatz von 0,1 bis 10,0 % Trypsin mit steigender Konzentration von 4,8 auf 4,2 sank. Auf Grund dessen ist in diesen Versuchen unter Umständen ein Teil der Veränderungen auf den pH Wert zurückzuführen, da er über den optimalen Wert hinaus verändert wurde. Die Sporoziten waren aber in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,1 bis 3,0 % Trypsinzusatz bei einem pH Wert zwischen 4,5 und 4,8 länger beweglich als in reiner physiologischer Kochsalzlösung ohne Trypsinzusatz bei pH 5. Bei diesen Konzentrationen könnte daher dem Trypsin eher eine gewisse protektive und bewegungsstimulierende Wirkung zugeschrieben werden. Bei 5,0 und 10,0 % Trypsinzusatz spielte der pH Wert ebenfalls höchstens eine untergeordnete Rolle, da hier die morphologischen Veränderungen anders als in Versuch 21 (pH Bereich) waren. Es ist dabei weiter zu beachten, daß in den Versuchen mit Trypsin keine Korrektur der pH Werte erfolgte und damit nicht das Wirkungsoptimum des Trypsins vorlag. Nach 24 Stunden hatte die Sporozoitendichte um etwa ein Viertel abgenommen. Im Gegensatz dazu waren von dem Excystationmedium, das außer 0,2 % Trypsin 8 % Galle enthielt, bei 39° C nach 10 Stunden sämtliche Sporoziten verdaut. Dies kann entweder auf einer additiven bzw. potenzierten

Wirkung der Galle beruhen, oder darauf, daß mit einem pH Wert von jetzt 7,0 nunmehr das Wirkungsoptimum für Trypsin vorlag. Immerhin scheint jedoch die enzymatische Tätigkeit der Galle eine große Rolle zu spielen, da sie - in unverdünnter Form und ohne Trypsinzusatz - bei 39° C nach 12 Stunden ebenfalls alle Sporozoiten verdaut hatte. Bei 24° und 4° C liefen im Excystationmedium dieselben Vorgänge, aber wesentlich verlangsamt ab, was zum Teil, wie in den vorherigen Versuchen, auf einen verminderten Stoffwechsel und eine verzögerte Wirkung endogener Enzyme zurückzuführen wäre, zum Teil aber in diesem Fall auch auf die bei niedrigeren Temperaturen verringerte Wirksamkeit der exogenen Enzyme.

Die Lebensfähigkeit von Sporozoiten in Trypsin - Galle - Lösungen scheint ebenso wie die Excystation in den gleichen Medien bei den einzelnen Eimeria - Arten unterschiedlich zu sein. So berichten DORAN und FARR (1962 b), daß bei 39° C in 0,25 %iger Trypsinlösung mit und ohne Zusatz von 1 % Natrium - Taurocholat oder 5 % Galle Sporozoiten von E. tenella und E. gallopavonis 3 bis 5 Stunden zur Excystation benötigten, während nach der gleichen Zeit E. acervulina und E. meleagridis - Sporozoiten, die bereits nach einer Stunde ausgeschlüpft waren, nicht mehr lebensfähig waren.

Bei der Untersuchung normal excystierter Sporozoiten in unterschiedlich konzentrierten Kochsalzlösungen wurden bei Zimmertemperatur und 39° C analoge Ergebnisse gefunden, wobei wiederum die Lebensdauer im höheren Temperaturbereich kürzer war. Es ergab sich ein optimaler Konzentrationsbereich von 0,7 bis 1,6 % Kochsalz. In diesen Grenzkonzentrationen wurden schon nach kurzer Zeit morphologische Veränderungen beobachtet, die aber reversibel waren. Bei Konzentrationen unter 0,7 und über 1,6 % kam es zu einer Abnahme der M - Werte bzw. der Beweglichkeit. Bis zu 0,4 % abwärts waren die morphologischen Veränderungen völlig, bei 0,3 % nur noch teilweise reversibel. Bei höheren Konzentrationen lag die Grenze der Fähigkeit von Sporozoiten, morphologische Veränderungen rückgängig zu machen, in Abhängigkeit von den Kriterien der Beurteilung der Gesamtpopulation bzw. des Einzelindividuums bei 2,3 % bzw. über 3 % Kochsalz -

Zusatz. Der Verlust der Beweglichkeit konnte - bezogen auf die gleichen Kriterien - nur bis zu einer Konzentration von 1,8 % völlig bzw. 2,9 % teilweise ausgeglichen werden.

Ein anderes Verhalten zeigte sich nach Excystation in höherprozentigen Kochsalzlösungen (bis zu 5 %). Hier waren die Sporozoiten wesentlich resistenter, solange sie Kontakt mit Trypsin und Galle hatten; denn nach dem Auswaschen dieser beiden Komponenten mit gleich stark konzentrierter Kochsalzlösung kam es bald zu einem Bewegungsverlust und zu Dehydratationserscheinungen. Daß diese stärkere Resistenz höchstwahrscheinlich auf den Zusatz von Trypsin und Galle zurückgeführt werden kann, ergibt sich aus Versuch 18, in dem in höher konzentrierten Kochsalzlösungen noch nach einer Stunde bei 39° C bis zu einem gewissen Grad die pathologischen Veränderungen reversibel waren. Da das 2 %ige Trypsin, das im Verhältnis 1 : 10 zugegeben wurde, in physiologischer Kochsalzlösung gelöst worden war, könnte es hierdurch zu einem geringgradigen Abfall des osmotischen Druckes gekommen sein. Es ist aber anzunehmen, daß dieser Druckabfall durch den Zusatz von unverdünnter Galle weitgehend kompensiert wurde. In Versuch 15 und 16 erwies sich jedoch auch die deutliche Verminderung des osmotischen Druckes als geeignet, bei einem Teil der Sporozoiten den Normalzustand wiederherzustellen. Durch weitere Versuche wäre zu klären, in welcher Weise und bis zu welchem Grad Trypsin, Galle oder der osmotische Druck bzw. eine Kombination dieser Faktoren an der Aktivierung der scheinbar zugrunde gegangenen Sporozoiten beteiligt sind. Die Aussage von ROBERTS, HAMMOND und SPEER (1970), daß Gallensalze die Motilität von Sporozoiten stimulieren, wäre hiermit dahingehend zu erweitern, daß sie den Sporozoiten außerdem in sehr ungünstigem Milieu einen gewissen Schutz geben könnten.

Gegen Zentrifugation zeigten sich die Sporozoiten erstaunlich resistent. Selbst bei 200.000 g war nur ein Verlust von ca. 25 % zu verzeichnen. Bis zur untersuchten oberen Grenze von 30.000 g war ein Einfluß der Zentrifugationszeit (bis zu 2 Stunden) nicht bemerkbar. Die überlebenden Sporozoiten hatten bei Zimmertemperatur lediglich eine etwas verkürzte Lebensdauer. Eine deutliche Abhängigkeit von der

relativen Zentrifugalbeschleunigung ließ sich jedoch nicht feststellen. Aus diesen Ergebnissen kann man ersehen, daß es nicht erforderlich ist, Sporozoiten beim Auswaschen oder zur Anreicherung besonders vorsichtig zu zentrifugieren.

Eine systematische Zuordnung der direkt und im Laufe der Zeit in den einzelnen Medien auftretenden morphologischen Veränderungen zu den einzelnen Bestandteilen dieser Medien ist bis auf einige Ausnahmen nicht möglich. Während als typische Veränderungen in physiologischer Kochsalzlösung mit den verschiedenen Kaliumbichromat - Konzentrationen die im Endstadium aufgetretenen undeutlichen Außenkonturen des Vorderendes und die vor dem Hyalinkörper sichtbaren Aufhellungszonen betrachtet werden können, wäre in den Medien mit Serumzusatz die mehr oder weniger deutliche Formveränderung durch Abstumpfung und Annahme einer etwas plumperen Gestalt bei gleichzeitig erhalten gebliebener Beweglichkeit als typisch anzusehen. Nicht auf das Medium, sondern auf die Schwerkraft zurückzuführen sind die nur bei einzelnen Sporozoiten sichtbar gewordenen, in Abb. Ib; 20 bis 28 wiedergegebenen Deformationen anzusehen (Versuch 25).

In den Kochsalzlösungen könnte unter Umständen noch zwischen dem zu Beginn auftretenden ballonartigen, teilweise die Lysis einleitenden Aufquellen der Sporozoiten in hypotonischen und dem Erstarren und Schrumpfen in hypertonischen Lösungen unterschieden werden. Als Endstadien waren in nahezu allen Medien (Versuch 12 bis 32) mit Ausnahme der nach der Lysis zurückbleibenden leeren Sporozoitenhüllen hauptsächlich die in Abb. Ia; 4, 5 und 6 dargestellten kleinen rundlichen Formen zu sehen.

Bemerkenswert war das teilweise bzw. völlige Verschwinden (Verdauen) der Sporozoiten in den Trypsin - und Galle - Lösungen, während die in den anderen Medien aufgetretene Dichteabnahme in der Regel durch Lysis zustande kam.

In einigen Versuchen war eine erstaunlich starke Adaptationsfähigkeit der Sporozoiten zu bemerken, die sich daran zeigte, daß sowohl morphologische Veränderungen rückgängig gemacht als auch verlorene Bewegungsfähigkeit wiedergewonnen werden konnten:

Versuch 13, in 5 und 10 %iger Trypsinlösung;

Versuch 15 bis 18, in 0,3 bis 0,7 %iger sowie in 1,6 bis 5,0 %iger Kochsalzlösung;

Versuch 19, in 0,001 bis 0,005 %iger Kaliumbichromat - Lösung;

Versuch 21, in physiologischer Kochsalzlösung bei pH 3 und 4;

Versuch 30, in Antibiotika - Lösung;

Versuch 31, in TC 199 (Difco) jeweils mit Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum, 10 % inaktiviertem Kälberserum und 5 % inaktiviertem Kaninchenserum.

Lysis wurde in verschiedenen Medien beobachtet, trat aber nicht immer in der gleichen Form auf. In Wasser, 0,1 bis 0,3 %iger Kochsalzlösung sowie in Aqua dest. mit einem Kaliumbichromat - Zusatz von weniger als 0,005 % wurden eine ballonartige Vergrößerung und anschließendes Platzen der Sporozoiten gesehen, wobei das Plasma an einer Stelle sichtbar herausströmte. In Aqua dest. mit 0,01 und 0,025 % Kaliumbichromat - Zusatz konnte dagegen ein Platzen nicht bemerkt werden. Der vergrößerte Sporozoit fiel plötzlich zusammen und erschien nunmehr nur noch als leere Hülle. Als Ursache könnten eine teilweise Ausfällung des Zellplasmas durch das eindiffundierte Kaliumbichromat, der dadurch verminderte Innendruck und die Elastizität der Sporozoitenhülle angenommen werden. Ob ein Austritt dieses gefällten Plasmas erfolgte, kann nicht gesagt werden; die "leeren" Sporozoiten glichen jedoch den in Aqua dest. lysierten vollkommen. Bei einer Konzentration von 0,05 % Kaliumbichromat kam es nach dem Aufquellen der Sporozoiten zu einem teilweisen Austritt des Zellplasmas in Form eines deutlich sichtbaren Eiweißgerinnsels (Abb. Ib; 38, 39) unter gleichzeitiger Verkleinerung des mit restlichem koaguliertem Plasma erfüllten Sporozoiten.

Ein "Ausschießen" von Plasma war auch in physiologischer Kochsalzlösung bei pH Werten von 10 bis 12 sichtbar. Es wurde jedoch keine vorherige ballonartige Größenzunahme beobachtet. Die Austrittsstelle war hier das Konoid, während sie bei den oben beschriebenen lytischen Vorgängen auf Grund der oft fast runden Gestalt nicht genauer lokalisiert werden konnte.

Das Auftreten von leeren, den lysierten ähnelnden Sporozoiten in den Versuchen 11 und 26 kam vermutlich durch eine Eintrocknung des Plasmas zustande.

Während die Lysis in diesen bisher beschriebenen Fällen hauptsächlich auf chemische oder physikalische Faktoren zurückzuführen ist, dürften die in manchen Seren und Medien mit Serumgehalt beobachteten lytischen Vorgänge, die sich offenbar sehr langsam und allmählich sowie nur an bereits pathologisch stark veränderten, zusammengeschrumpften Sporozoiten abspielten, eher mit einer Wirkung von Antikörpern oder Komplement zu begründen sein. Letztere Faktoren könnten auch die Ursache für die in verschiedenen Seren beobachtete Agglutination sein. Dagegen ist anzunehmen, daß die Verklumpung in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von Kaliumbichromat und in gallehaltigen Medien durch die chemische Veränderung einer die Sporozoiten vermutlich überziehenden Schleimschicht bewirkt wird.

Eine mögliche praktische Nutzanwendung der eigenen Versuchsanordnung und Versuche wäre bei der Vorbereitung und Durchführung der Züchtung von Kokzidien in Gewebekulturen gegeben. Aus den bisher diskutierten Gesichtspunkten können Schlußfolgerungen auf die Art der Vorbehandlung der Sporozoiten und dabei notwendige oder überflüssige Vorichtsmaßnahmen gezogen werden. Mit der gleichen Versuchsanordnung lassen sich aber auch das Zellkulturmedium und seine Bestandteile auf ihre Eignung als Inoculationsmedium untersuchen.

In dem in Versuch 29 geprüften Gesamtmedium waren die Sporozoiten im Vergleich zu der Grundsubstanz TC 199 (Difco) mit und ohne Antibiotika - Zusatz bedeutend weniger lebensfähig. Die schädigenden Komponenten konnten demnach nur die verschiedenen Seren sein. Aus den weiteren Ergebnissen (Versuch 30 und 31) war ersichtlich, daß die Lysis hauptsächlich durch den Gehalt an inaktiviertem Kälberserum verursacht wurde, während das inaktivierte Kaninchenserum vor allem die Agglutination förderte. Als am wenigsten schädlich erwies sich ein Zusatz von fetalem Kälberserum, wahrscheinlich auf Grund der fehlenden Antikörper.

In der Praxis wäre also zwischen der Notwendigkeit eines Serumzusatzes und seiner möglichen Einwirkungen auf die Sporozoiten, zumindest im Inoculationsmedium, abzuwägen.

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von Serum von Kaninchen in unterschiedlichem Immunzustand und verschiedener nicht spezifischer Wirte überprüft. Dabei kam die Motilität der E. stiedai - Sporozoiten in Serum immuner Kaninchen schon nach 5 bis 15 Minuten zum Erliegen und hielt bei stetigem Nachlassen auch in inaktiviertem und nicht inaktiviertem Normalserum höchstens 30 bis 60 Minuten lang an. Ähnlich wie bei den Immunseren waren die Versuchsergebnisse in den Seren der nichtspezifischen Wirte. Parallel zur Abnahme der Beweglichkeit kam es in allen Seren zu einer sehr schnellen Abnahme der M - Werte. Dagegen berichten LONG, ROSE und PIERCE (1963) sowie HERLICH (1965) über eine teilweise länger als 2 Stunden anhaltende Bewegungsfähigkeit bei E. tenella - und E. acervulina - Sporozoiten in Normal-, Immun- und Hyperimmunserum.

Eine vergleichende Darstellung der bei den einzelnen Autoren aufgetretenen Lysis und Agglutination gibt die Tabelle 31.

HERLICH (1965) berichtet, daß es in Hyperimmun- und Immunserum zu keiner Agglutination kam, während bei den eigenen Versuchen in allen Kaninchenseren (außer in verdünntem Immunserum) und in einem Teil der Fremdseren Agglutination beobachtet wurde. Bei den übrigen Autoren liegen keine Angaben zur Agglutination vor.

Auffallend sind die widersprüchlichen Ergebnisse über den lytischen Effekt von Normalserum auf E. tenella - Sporozoiten bei LONG, ROSE und PIERCE (1963) (keine Lysis) sowie BURNS und CHALLEY (1965) (Lysis). In den eigenen Versuchen wurde nur in einem von zwei inaktivierten Kaninchen - Normalseren Lysis beobachtet, nicht jedoch in Normalserum. In Immunserum stimmen die Ergebnisse von LONG, ROSE und PIERCE (1963) mit denen von BURNS und CHALLEY (1965) sowie mit den eigenen überein, stehen aber wiederum zu denen von HERLICH (1965) im Widerspruch.

Tabelle 31

Vergleichende Zusammenstellung des Auftretens von Lysis (L)
und Agglutination (A) in Serum

Serum	LONG, ROSE u. PIERCE (1963) E. tenella	HERLICH (1965) E. tenella E. acervu- lina	BURNS u. CHALLEY (1965) E. tenella	Eigene Ergebnisse (1971) E. stiedai
Normalserum	L -	---	L +	L - A +
inaktiv. Normalserum	L -	---	---	1) L - 2) L + A +
1 : 3 verd. Normalserum	---	---	L -	---
Hyperimmun- serum	---	L - A -	---	---
Immun- serum	L +	L - A -	L +	L + A +
inaktiv. Immunserum	L -	---	---	L - A +
inaktiv. Immunserum + Komplement	L +	---	---	---
Immunserum 1:3 bis 1:24 verd.	L +	---	---	L + A -
Fremd- serum	---	---	---	unterschied- lich L + / L - A + / A -

Aus den Angaben von LONG, ROSE und PIERCE (1963) (Beseitigung des lytischen Effektes von Immunserum durch Erhitzen und Wiederherstellung durch Zusatz von Komplement oder Normalserum) ließe sich folgern, daß die Lysis durch Komplement - abhängiges Lysin zustande kommt. Die abweichenden Ergebnisse der eigenen Versuche mit inaktiviertem Normalserum lassen dies jedoch fraglich erscheinen.

In der Literatur werden keine Versuche mit Fremdseren beschrie-

ben. Das schnelle Zugrundegehen der E. stiedai - Sporozoiten in Serum verschiedener Tierarten, über deren Immunität nichts bekannt war, läßt die Frage offen, ob es sich sowohl bei den Lysinen als auch bei den anderen, die Sporozoiten inaktivierenden Faktoren nicht um irgendwelche unspezifische, nur zum Teil komplementabhängige Antikörper handelt. Weitere Untersuchungen wären auch auf diesem Gebiet notwendig.

Die geringe Vitalität der Sporozoiten von E. stiedai in den Kaninchenserum der SPF - Tiere steht im Einklang mit den in der Literatur berichteten Tatsachen über den Infektionsweg der Sporozoiten vom Darm zur Leber. Danach konnten bisher in keinem Fall freie Sporozoiten im Portalblut nachgewiesen werden. HORTON (1967) sowie PELLERDY und DÜRR (1970) fanden Sporozoiten in den Mesenterial - Lymphknoten, FITZGERALD (1970) berichtet über Sporozoiten in Monocyten des Portalblutes, und erst in den Kapillarvenen der Leber fanden PELLERDY und DÜRR (1970) wieder freie Sporozoiten. Es wäre also wahrscheinlich, daß auch bei parenteraler Verabreichung von Sporozoiten der Transport von Sporozoiten in Makrophagen erfolgt, obwohl FITZGERALD (1970) in diesem Fall ebenso wie PELLERDY und DÜRR (1970) bei der natürlichen Infektion den Transport freier Sporozoiten im Blut für möglich erklären.

Abschließend und einschränkend muß zu den eigenen Versuchen noch gesagt werden, daß sich alle Untersuchungen nur auf die Lebensfähigkeit in vitro gehaltener Sporozoiten bezogen haben. Solange keine Untersuchungen, die im vorliegenden Fall aus finanziellen Gründen nicht möglich waren, über Korrelationen zwischen der Lebensfähigkeit und Infektionsfähigkeit von Sporozoiten im Wirt und in der Gewebekultur vorliegen, gilt der Vorbehalt von ROSE (persönliche Mitteilung): "We are beginning to believe that viability cannot necessarily be equated with infectivity".

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In vergleichenden Untersuchungen wurde der Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auf die Excystation und Lebensfähigkeit von Eimeria stiedai - Sporozoiten in vitro geprüft. Die benötigten Sporocystensuspensionen wurden mittels Filtration zermörserter Oocysten durch Watte gewonnen und gereinigt. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- 1) Sporozoiten aus 1 bis 12 Monate alten Oocysten excystierten bei 39° C nach 30 Minuten zu 90 bis 95 % in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 0,2 % Trypsin und 8 % Galle in einem pH Bereich von 5,5 bis 8,5 (Versuch 1 u. 7).
- 2) Bei 0,2 %igem Trypsin - Zusatz excystierten in physiologischer Kochsalzlösung - unabhängig vom pH Wert - aus ungereinigten Sporocysten maximal 60 % der Sporozoiten, aus gereinigten nur ca. 5 %. Mit höherem Trypsin- Zusatz konnte keine bessere Excystation erzielt werden (Vorversuche u. Versuch 2).
- 3) In 8 %iger Galle wurde der maximale Excystationswert von 95 % nach 2 bis 3 Stunden bei pH 7,0 und pH 7,5 erreicht. In unverdünnter Galle betrug die Excystationsrates nach 5 Stunden 40 % (Versuch 3 u. 4).
- 4) Trypsinlösung und Galle waren bei + 4° C mindestens 3 Monate lang voll wirksam (Versuch 5).
- 5) Kaliumbichromat - Konzentrationen über 0,1 % verhinderten die Excystation (Versuch 6).
- 6) Die Excystation war in höherprozentigen Kochsalzlösungen altersabhängig und fand bei 1 bis 3 Monate alten Oocysten bei einem Kochsalz - Zusatz bis zu 5 % statt (Versuch 7 u. 17).
- 7) Bei Aufbewahrung von Sporocysten bei + 4° C in physiologischer Kochsalzlösung ließ die Excystationsfähigkeit der Sporozoiten nach 3 Wochen, bei Aufbewahrung in Aqua dest. nach 4 Tagen allmählich nach. Bei Lagerung in höheren Temperaturbereichen war die Haltbarkeit der Sporocysten geringer (Versuch 8 u. 9).

- 8) Ein Zusatz von Kaliumbichromat in Konzentrationen von 0,05 bis 2,0 ‰ erwies sich bei der Aufbewahrung von Sporocysten bei + 4° C für länger als 1 bis 6 Stunden als nicht geeignet (Versuch 10).
- 9) Aus Sporocysten, die kurze Zeit eingetrocknet waren, excystierten Sporozoiten, die morphologisch zum größten Teil lysierten Sporozoiten glichen und nicht beweglich waren (Versuch 11).
- 10) Die Lebensdauer excystierter Sporozoiten verringerte sich mit zunehmender Temperatur der Aufbewahrungsmedien (Versuch 12, 15, 16, 23 u. 24).
- 11) Optimale Aufbewahrungsbedingungen für Sporozoiten bot Kochsalzlösung im Konzentrationsbereich von 0,7 bis 1,6 ‰ bei einem pH Bereich von 5,0 bis 8,0 (Versuch 15, 16 u. 21 u. 22).
- 12) In nicht sofort tödlich wirkenden Medien zeigten die Sporozoiten teilweise eine erstaunliche Adaptationsfähigkeit. Sowohl morphologische Veränderungen als auch der Verlust der Beweglichkeit waren reversibel (Versuch 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 30 u. 31).
- 13) Trypsin- und Galle - Zusatz verminderte die Lebensdauer in physiologischer Kochsalzlösung, wirkte jedoch protektiv und bewegungsstimulierend in 2 bis 5 ‰igen Kochsalzlösungen (Versuch 12, 13, 14, 17 u. 18).
- 14) Kaliumbichromat erwies sich in Konzentrationen über 0,0008 ‰ in physiologischer Kochsalzlösung als toxisch für Sporozoiten (Versuch 19).
- 15) 30 Minuten lange Zentrifugation bis zu 200.000 g bewirkte eine maximale Verlustrate von 25 ‰. In Abhängigkeit von der relativen Zentrifugalbeschleunigung war bei den überlebenden Sporozoiten eine nur unbedeutend verringerte Vitalität feststellbar (Versuch 25).
- 16) Nach Eintrocknung gingen die Sporozoiten sofort zugrunde (Versuch 26).
- 17) Serum spezifischer und unspezifischer Wirtstiere hatte - unverdünnt und verdünnt - eine stark vitalitätsvermindernde Wirkung auf Sporozoiten. Lysis bzw. Agglutination traten sowohl in Immunserum bzw.

in Normalserum von Kaninchen als auch in Seren von Fremdwirten auf (Versuch 27, 28, 29, 30 u. 31).

- 18) Sporozoiten aus 1 bis 6 Monate alten Oocysten besaßen bei Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung bei 39⁰ C etwa die gleiche Lebensfähigkeit, während solche aus 12 Monate alten Oocysten eine kürzere Lebensdauer hatten (Versuch 32).

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Augustin, R. und Ridges, A.P.: Immunity mechanism in Eimeria meleagridis. Immunity to Protozoa, ed.: Garnham, P.C.C., Pierce, A.E. und Roitt, J.: Blackwell Sci. Publ. Oxford, 296 - 335 (1963)
- Ayeni, A.O. und Dürr, U.: Vergleichende Sauerstoffverbrauchsmessungen bei Kokzidien der Gattung Eimeria (Protozoa, Sporozoa). In Vorbereitung (1971)
- Beach, J.R. und Corl, J.C.: Studies in the control of avian coccidiosis. Poultry Science 4, 83 - 93 (1925)
- Bunch, T.D. und Nyberg, P.A.: Effects of carbon dioxide on coccidian oocysts from 6 host species. J. Protozool. 17, 364 - 369 (1970)
- Burns, W.C. und Challey, J.R.: Serum lysins in chickens infected with Eimeria tenella. J. Parasit. 51, 660 - 668 (1965)
- Doran, D.J.: Pancreatic enzymes initiating excystation of Eimeria acervulina sporozoites. Proc. Helm. Soc. Wash. 33, 42 - 43 (1966)
- Doran, D.J.: Freezing excysted coccidial sporozoites. J. Parasit. 55, 1229 - 1233 (1969)
- Doran, D.J.: Survival and development of Eimeria adenoeides in cell cultures inoculated with sporozoites from cleaned and incleaned suspensions. Proc. Helm. Soc. Wash. 37, 45 - 48 (1970 a)
- Doran, D.J.: Eimeria tenella: from sporozoites to oocysts in cell culture. Proc. Helm. Soc. Wash. 37, 84 - 92 (1970 b)
- Doran, D.J.: Effect of age and freezing on development of Eimeria adenoeides and E. tenella sporozoites in cell culture. J. Parasit. 56, 27 - 29 (1970 c)
- Doran, D.J.: Freeze-preservation of Eimeria. J. Parasit. 56, 46 (1970 d)

- Doran, D.J. und Farr, M.M.: Bacteria-free suspension of Eimeria acervulina sporozoites and effect of antibiotics on excystation. J. Parasit. 47, Suppl. 34 (1961 a)
- Doran, D.J. und Farr, M.M.: In vitro excystation of Eimeria acervulina. J. Parasit. 47, Suppl. 103 (1961 b)
- Doran, D.J. und Farr, M.M.: Excystation of the poultry coccidium Eimeria acervulina. J. Parasit. 9, 154 - 161 (1962 a)
- Doran, D.J. und Vetterling, J.M.: Comparative cultivation of poultry coccidia in mammalian kidney cell cultures. J. Protozool. 14, 657 - 662 (1967 a)
- Doran, D.J. und Vetterling, J.M.: Cultivation of the turkey coccidium Eimeria meleagridis in mammalian kidney cell cultures. Proc. Helm. Soc. Wash. 34, 59 - 65 (1967 b)
- Doran, D.J. und Vetterling, J.M.: Preservation of coccidial sporozoites by freezing. Nature 217, 1262 (1968 a)
- Doran, D.J. und Vetterling, J.M.: Survival and development of Eimeria meleagridis in bovine kidney and turkey intestine cell cultures. J. Protozool. 15, 796 - 802 (1968 b)
- Doran, D.J. und Vetterling, J.M.: Influence of storage period on excystation and development in cell culture of sporozoites of Eimeria meleagrimidis TYZZER, 1929. Proc. Helm. Soc. Wash. 36, 33 - 35 (1969 a)
- Doran, D.J. und Vetterling, J.M.: Infectivity of two species of poultry coccidia after freezing and storage in liquid nitrogen vapour. Proc. Helm. Soc. Wash. 36, 30 - 33 (1969 b)
- Dürr, U.: Zur Excystation und Bewegung von Sporozoiten der Kokzidien-art Eimeria stiedai. In Vorbereitung (1971)
- Farr, M.M. und Doran, D.J.: Comparative excystation of four species of coccidia. J. Protozool. 9, 403 - 407 (1962 b)
- Fayer, R. und Hammond, D.M.: Development of first generation schizonts of Eimeria bovis in cultured bovine cells. J. Protozool. 14, 764 - 772 (1967)

- Fitzgerald, P.R.: New findings on the life cycle of Eimeria stiedae.
J. Parasit. 56, 100 - 101 (1970)
- Herlich, H.: Effect of chicken antiserum and tissue extracts on the
oocysts, sporozoites, and merozoites of Eimeria tenella and
Eimeria acervulina. J. Parasit. 51, 847 - 851 (1965)
- Hibbert, L.E. und Hammond, D.M.: The influence of temperature on
in vitro excystation of certain bovine coccidia. J. Protozool.
13, Suppl. 17 (1966)
- Hibbert, L.E., Hammond, D.M. und Simmons, J.R.: The effects of
pH, buffers and bile acids on excystation of sporozoites of
various Eimeria species. J. Protozool. 16, 441 - 444 (1969)
- Horton, R.J.: The route of migration of Eimeria stiedae (Lindemann,
1865) sporozoites between the duodenum and bile ducts of the
rabbit. Parasitology 57, 9 - 17 (1967)
- Jackson, A.R.B.: Excystation of Eimeria arloingi (Marotel, 1905):
Stimuli from the host sheep. Nature 194, 847 - 849 (1962)
- Jackson, A.R.B.: The isolation of viable coccidial sporozoites. Para-
sitology 54, 87 - 93 (1964)
- Kouwenhoven, B.: The possibility of low-temperature freezing of
Eimeria tenella sporocysts. Tschr. diergeneesk. 92,
1639 - 1642 (1967)
- Landers, E.J. und Colley, F.C.: In vitro excystation of sporulated
oocysts of Eimeria nieschulzi. J. Parasit. 50, Suppl. 52
(1964)
- Long, P.L.: Studies on the viability of sporozoites of Eimeria tenella.
Z. Parasitenk. 35, 1 - 6 (1970)
- Long, P.L., Rose, M.E. und Pierce, A.E.: Effects of fowl sera on
some stages in the life cycle of Eimeria tenella.
Parasit. 14, 210 - 217 (1963)
- Lotze, J.C. und Leek, R.G.: Some factors involved in excystation of
the sporozoites of three species of sheep coccidia.
J. Parasit. 46, 46 - 47 (1960)

- Lotze, J.C. und Leek, R.G.: A cold storage technic for studying excystation of Eimeria tenella. J. Protozool. 14, 231 - 232 (1967)
- Metzner, R.: Untersuchungen an coccidium cuniculi. Arch. Protistenk. 2, 13 - 72 (1903)
- Norton, C.C., Pout, D.D. und Joyner, L.P.: Freeze preservation of Eimeria acervulina TYZZER, 1929. Fol. Parasitol. 15, 203 - 211 (1968)
- Nyberg, P.A., Bauer, D.H. und Knapp, S.E.: Carbon dioxide as the initial stimulus for excystation of Eimeria tenella oocysts. J. Protozool. 15, 144 - 148 (1968)
- Nyberg, P.A. und Hammond, D.M.: In vitro excystation of Eimeria bovis oocysts. J. Parasit. 49, Suppl. 20 (1963)
- Nyberg, P.A. und Hammond, D.M.: Excystation of Eimeria bovis and other species of bovine coccidia. J. Protozool. 11, 474 - 480 (1964)
- Pellérdy, L. und Dürr, U.: Zum endogenen Entwicklungszyklus von Eimeria stiedai (LINDEMANN, 1865) KISSKALT & HARTMANN, 1907. Acta Vet. Hung. 20, 227 - 244 (1970)
- Roberts, W.L. und Hammond, D.M.: Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoites of four Eimeria species. J. Protozool. 17, 76 - 86 (1970)
- Roberts, W.L., Hammond, D.M. und Speer, C.A.: Electron and light microscope studies of the oocysts walls, sporocysts, and excysting sporozoites of Eimeria callospermophili and E. lari-merensis. J. Parasit. 56, 918 - 926 (1970)
- Romeis, B.: Mikroskopische Technik, 1948
- Rose, M.E.: A study of the life cycle of Eimeria stiedae (LINDEMANN, 1865) and the immunological response of the host. Dissertation Girton College Cambridge (1959)
- Schneider, D., Ayeni, A.O. und Dürr, U.: Zur physikalischen Resistenz von Kokzidienocysten. In Vorbereitung (1971)

- Shibalova, T.A. und Korolev, A.M.: Excystation of sporozoites of Eimeria tenella in vitro and their cultivation in cell culture. Abstr. 3. Intern. Congr. Protozool., Leningrad, 387 (1969)
- Speer, C.A., Hammond, D.M. und Kelley, G.L.: Stimulation of motility in merozoites of five Eimeria species by bile salts. J. Parasit. 56, 927 - 929 (1970)
- Wagenbach, G.E.: Purification of Eimeria tenella sporozoites with glass bead columns. J. Parasit. 55, 833 - 838 (1969)

Herrn Professor Dr. G. Lämmle danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Dürr für seine wertvollen Anregungen und die mir jederzeit gewährte freundliche Beratung und Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 26. Dezember 1942 wurde ich als letztes von fünf Kindern des Einzelprokuristen Erwin Krieg und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Lösch, in Karlsruhe geboren. Von 1949 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in meinem Geburtsort, anschließend ein weiteres Jahr in Baden - Baden. Dort trat ich 1953 in das Gymnasium Hohenbaden ein. Im Frühjahr 1962 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1962 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität zu Gießen. Hier bestand ich im Oktober 1963 den naturwissenschaftlichen, im Oktober 1964 den anatomisch - physiologischen Abschnitt der Tierärztlichen Vorprüfung. Nach einem Semester an der Tierärztlichen Hochschule in Wien setzte ich im Wintersemester 1965/66 das Studium in Gießen fort und bestand hier am 11. März 1968 das Tierärztliche Staatsexamen.

Meine Veterinärpraktikantenzeit leistete ich vom 15. März bis zum 15. September 1968 bei Herrn Dr. med. vet. Hans Lennartz in Bensberg ab. Mit Wirkung vom 15. September 1968 erhielt ich die Approbation als Tierarzt. Bis zum April 1970 blieb ich bei Herrn Dr. Hans Lennartz in Bensberg als tierärztlicher Assistent und Vertreter.

